

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kati Hensen

**Bakteriofaag T7 transkriptsioonisüsteemi kasutamine  
Semliki Forest viiruse genoomi ja replikon-süsteemi  
RNA-de vabastamiseks plasmiidsetest vektoritest  
eukarüootses rakus**

Bakalaureusetöö

Juhendaja doktorant Age Utt

Kaasjuhendaja prof. Andres Merits

TARTU 2013

# SISUKORD

<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>3</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>4</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>	<b>5</b>
1.1. ALFAVIIRUSED .....	5
1.1.1. Virion.....	5
1.1.2. Genoom .....	6
1.1.4. SFV infektsioonitsükkel .....	8
1.2. T7 AUTOGEENSÜSTEEM.....	10
1.2.1. T7 RNA polümeraas.....	11
1.2.2. Autogeensüsteemid .....	12
1.3. ALFAVIIRUSTE REPLIKONVEKTORSÜSTEEMID.....	15
1.3.1. Replikonide ja helperite ehitus.....	15
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....</b>	<b>17</b>
2.1. TÖÖ EESMÄRGID .....	17
2.2. MATERJALID JA MEETODID .....	18
2.2.1. Bakteritüved ja söötmed .....	18
2.2.2. Plasmiidid .....	18
2.2.3. DNA puhastamine ja analüüs .....	19
2.2.4. Rakuliinid ja söötmed.....	19
2.2.5. DNA transfektsioon BHK-21 ja T7-BHK rakkudesse .....	19
2.2.6. VRP-de tootmine.....	20
2.2.7. VRP-de tiiterdamine.....	20
2.2.8. Western blot analüüs .....	20
2.2.9. Viiruse tootmine ja infektsioonitsentrite test (ICA).....	21
2.2.10. Viiruse tiiterdamine .....	22
2.3. TULEMUSED JA ARUTELU .....	22
<b>KOKKUVÕTE.....</b>	<b>34</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>36</b>
<b>KIRJANDUSE LOETELU.....</b>	<b>38</b>
<b>LIHTLITSENTS .....</b>	<b>47</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

**CAT** – klooramfenikooli atsetüültransferaas (*chloramphenicol acetyltransferase*)

**cDNA** – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)

**CHIKV** – Chikungunya viirus (*Chikungunya virus*)

**CMC** – karboksümetüültselluoos (*carboxymethylcellulose*)

**CMV** – tsütomegaloviirus (*cytomegalovirus*)

**DTT** – ditiotreitool (*dithiothreitol*)

**FCS** – veise loote seerum (*fetal calf serum*)

**FMDV** – suu- ja sõrataudi viirus (*foot and mouth disease virus*)

**ICA** – infektsioonitsentrite test (*infectious center assay*)

**IRES** – sisemine ribosoomi seondumispiirkond (*internal ribosome entry site*)

**mEF1a** – hiire elongatsioonifaktor-1 alfa (*mouse elongation factor-1 alpha*)

**nsP** – mittestruktuurne valk (*non-structural protein*)

**PBS** – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)

**RNAP** – RNA polümeraas (*RNA polymerase*)

**SG** – subgenoomne (*subgenomic*)

**SFV** – Semliki Forest viirus (*Semliki Forest virus*)

**TPB** – trüptoos-fosfaadi puljong (*tryptose phosphate broth*)

**UTR** – mittekodeeriv regioon (*untranslated region*)

**VRP** – viirus-replikon partikkel (*virus-replicon particle*)

**wt** – metsiktüüp (*wild type*)

# SISSEJUHATUS

Viirused on elusa ja eluta looduse piiril olevad bioloogilised objektid, mis suudavad paljuneda ainult rakus. Oma tegevusega võivad nad mõjutada rakkude normaalset talitlust ja põhjustada erinevaid haigusnähte. Paljud neist on ohtlikud ka inimestele ja meie jaoks olulistele koduloomadele ja kultuurtaimedele. Alfaviirused on ülemaailmse levikuga viirused, mille genoomiks on üheaahelaline positiivse polaarsusega RNA. Nende selgroogseteks pärisperemeesteks on linnud, imetajad ja kalad, kuid ühelt peremehelt teisele levivad nad lülialgsete vektorite teel. Oluline on uurida nende ehitust, infektsioonitsükli ja interaktsioone peremeesrakuga, et oleks võimalik välja töötada viirusvastaseid vaktsiine ja viirushaiguste ravimeid.

Selle bakalaureusetöö teoreetiline osa annab lühiülevaate T7 autogeensüsteemist ning selle kasutamisest võõrgeenide ekspresseerimiseks eukarüootsetes rakkudes. Seda süsteemi on võimalik rakendada DNA vaksineerimises ja geeniteraapias. Lisaks antakse ülevaade alfaviiruste virionist, genoomist, replikatsioonist, valkudest ja replikon-vektorsüsteemist. Töös keskendutakse peamiselt Semliki Forest viirusele (SFV), mille laboratoorsed tüved on inimesele apatogeensed, mistõttu on tegemist väga hea alfaviiruste uurimisel kasutatava mudelobjektiga.

Töö eksperimentaalses osas testiti erinevaid T7 autogeensüsteeme, mille abil prooviti toota SFV viirus-replikon partikleid (VRP) ja infektsioonilisi viiruseid. VRP-d meenutavad viirust, kuid ei ole võimelised produktiivseks infektsiooniliks, sest neis puudub osa viiruse geneetilisest materjalist. Nad on olulised nii viiruste uurimisel kui vaktsiinide väljatöötamisel. Kui tavaliselt kasutatakse VRP-de tootmiseks peremeesrakkude elektroporeerimist katseklaasis sünteesitud RNA-ga, siis käesolevas töös uuriti, kas sama on võimalik teha ka DNA-ga. See on oluline, sest nii muutuks VRP-de tootmise kiiremaks ja vähem kulukamaks.

Käesolev töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis ja eksperimentaalne uurimistöö on tehtud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis. Autor soovib tänada oma juhendajaid, Age Utti ja Andres Meritsat, ning kolleege laborist abi ja kasulike nõuannete eest.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. ALFAVIIRUSED

Alfaviirused on viiruste perekond, mida iseloomustab üheaahelaline positiivse polaarsusega RNA genoom ja membraaniga kaetud virionid. Koos rubiviirustega kuuluvad alfaviirused sugukonda *Togaviridae*. Alfaviiruste perekonda kuulub praegu 29 erinevat liiki viiruseid (Weaver jt., 2005), mis jagunevad kaheksasse erinevasse gruppi - kompleksi (Powers jt., 2001). Alfaviirused on väga laia levikuga, neid on isoleeritud kõigilt kontinentidelt peale Antarktika (Calisher ja Karabatsos, 1988).

Alfaviiruste selgroogseteks peremeesteks on imetajad, linnud ja kalad. Nende rakkudes on alfaviiruse infektsioon kiire ja tavaliselt rakule letaalne (Strauss ja Strauss, 1994; Griffin, 2007). Ühest organismist teise levivad alfaviirused lüljalgsete vektoritega, tavaliselt sääskedega. Nendes avaldub alfaviiruse infektsioon teisiti kui pärisperemehes - vektorile avaldatakse bioloogiliselt minimaalset mõju, tänu millele kujuneb neis persistentne infektsioon (Weston jt., 1999; Weston jt., 2002).

Alfaviirused jagunevad leviku piirkonna järgi Vana ja Uue Maaailma alfaviirusteks. Uue Maaailma alfaviirused põhjustavad inimestel ja mitmetel koduloomadel entsefaliiti, samas kui Vana Maaailma alfaviirused tekitavad peamiselt artriiti ja löövet (Griffin, 2007; Smith jt., 2009). Uue Maaailma alfaviiruste seas on ka potentsiaalseid biorelvi ja ohtlikke looduslikke patogeene, mis kuuluvad Rahvusvahelise Allergiate ja Nakkushaiguste Instituudi prioriteet B patogeenide nimekirja (Sherman ja Weaver, 2010).

### 1.1.1. Virion

Alfaviiruste virion on umbes 70 nm diameetriga partikkel. Virioni pealispinna moodustab lipiidne ümbris, mille sees on ikosaeedriline (kakskümmendtahukas) nukleokapsiid (NC), millel on T=4 sümmeetria (Tong jt., 1993). NC on kokku pandud 240 koopiast kapsiidivalgust, mis on seotud viiruse genoomse RNA-ga (Strauss ja Strauss, 1994). Partiklis esinevad kapsiidivalgud heksonite ja pentonitena (Weiss jt., 1989; Tong jt., 1993).

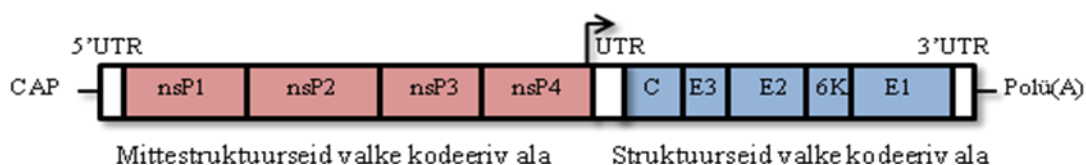
Partikli membraan koosneb lipiidsest kaksikkihist, mis kõikidel alfaviirustel sisaldab viiruse poolt kodeeritud kahte erinevat glükoproteiini – E1 ja E2. Kumbagi nendest on virionis 240

koopiat ja nad moodustavad 80 trimeerset ogalaadet struktuuri (Strauss ja Strauss, 1976; Harrison, 1986). E1 vastutab viiruse membraani ja raku endosoomse membraani fusiooni eest samal ajal kui E2 on oluline virioni retseptorile seondumisel ja sellele järgneval endotsütoosil (Smith jt., 1995). Ogade kokkupakkimiseks on vaja E3 valku, mis jääb suuremas (SFV) või väiksemas koguses (enamus alfaviiruseid) ka virioni struktuuri (Strauss ja Strauss, 1994). Lisaks on virionis ka 7-30 koopiat 6K valku (Lusa jt., 1991; Strauss ja Strauss, 1994; Kielian jt., 2000), mis on oluline E1 valgu transportimises ER-i (Gaedigk-Nitschko jt., 1990; Liljeström ja Garoff, 1991).

### 1.1.2. Genoom

Alfaviiruse nukleokapsiid sisaldab umbes 11 500 nukleotiidi jäägi pikkust genoomi (Strauss ja Strauss, 1994). Genoomi 5'-otsas on *cap0*-struktuur ja 3'-otsas polü(A) järjestus (Joonis 1) (Strauss ja Strauss, 1986). Genoom on jaotunud kaheks osaks: kaks kolmandikku 5'-otsast, mis kodeerib mittestruktuurseid ehk replikaasi valke, ja üks kolmandik 3'-otsast, mis kodeerib viiruse struktuurseid valke (Strauss ja Strauss, 1994).

Mittestruktuursed valgud transleeritakse otse genoomselt RNA-lt ühe või kahe polüproteiinina (oleneb viirusest), mis hiljem lõigatakse lahti valmis nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4 valkudeks. Struktuurne domeen transleeritakse ühe polüproteiinina subgenoomselt (SG) mRNA-lt, millel on samuti *cap0*-struktuur ja polü(A) järjestus. Struktuursete valkude hulka kuuluvad E1 ja E2 membraanivalgud, kapsiidivalk ja väikesed polüpeptiidid E3 ja 6K (Strauss ja Strauss, 1994).



**Joonis 1. Alfaviiruste genoomi ülesehitus.** 5' poolses osas paikneb mittestruktuurseid valke (nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4) kodeeriv ala ja 3' poolses osas struktuurseid valke (kapsiidivalk, E3, E2, 6K ja E1) kodeeriv ala. Noolega on tähistatud SG RNA alguskoht. Valgega tähistatud UTR-id on mittetransleerivad piirkonnad. (Koostatud Strauss ja Strauss, 1994 järgi)

### 1.1.3. Mittestruktuursed valgud

NsP1 on vajalik negatiivse polaarsusega RNA sünteesi initsiatsiooniks ja elongatsiooniks (Strauss ja Strauss, 1994). Tal on metüül- ja guanüülültransferaasne aktiivsus, mis on vajalikud mRNA-le *cap0*-struktuuri lisamiseks (Ahola jt., 1997). Lisaks kinnitab ta alfaviiruse replikatsioonikompleksid raku membraanidele (Peränen jt., 1995).

NsP2 on vajalik SG mRNA sünteesi initsieerimiseks (Strauss ja Strauss, 1994). Nagu nsP1-ki, osaleb nsP2 viraalsetele mRNA-dele *cap0*-struktuuri lisamises (Vasiljeva jt., 2000). Tema N-terminaalne domeen on RNA helikaas, RNA-trifosfataas ja nukleosiidtrifosfataas ning C-terminaalne domeen vastutab mittestruktuurse polüproteiini protsessimise eest (Rikkonen jt., 1994; Strauss ja Strauss, 1994; Vasiljeva jt., 2000). Lisaks sellele on näidatud, et alfaviiruste nsP2 võib osaleda ka nakatatud rakkudes raku-spetsiifilise transkriptsiooni ja translatsiooni mahasurumises. On teada, et nsP2 on Vana Maaailma alfaviiruste valkudest kõige olulisem tsütopatogeensuse põhjustaja (Frolov ja Schlesinger, 1994).

NsP3 on vajalik replikatsioonikomplekside moodustumiseks ja nende korrektseks paiknemiseks (Salonen jt., 2003) ning koos teiste mittestruktuursete valkudega ka RNA sünteesiks (Raju jt., 1999). NsP3 koosneb kolmest domeenist. Esimene neist on makrodomeen ehk X-domeen, mis on konserveerunud alfaviirustes, koronaviirustes, hepatiit E ja rubella viiruses (Pehrson ja Fuji, 1998). Selle domeeniga on seotud ainuke teadaolev nsP3 ensümaatilise aktiivsuse – adenosindifosforiboosi 1'-fosfaadi fosforüleerimine, kuid seda on siiani täheldatud ainult Chikungunya (CHIKV) ja Venezuela Hobuste Entsefaliidi viirustel (Malet jt., 2009). Teine, tsinki seondav domeen on konserveerunud ainult alfaviirustes (Shin jt., 2012) ja kolmas domeen varieerub erinevatel viirustel nii pikkuselt kui järjestuselt; samas mõjutab see domeen oluliselt SFV virulentsust (Galbraith jt., 2006; Varjak jt., 2010).

NsP4 on viiruse RNA-st sõltuva RNA polümeraasi ensümaatilisel aktiivseks subühikuks, moodustades kompleksi teiste mittestruktuursete valkudega. NsP4 tunneb ära transkriptsiooni alguskohad ja sünteesib nii positiivse kui negatiivse polaarsusega RNA-sid. Arvatakse, et nsP4 osaleb ka viiruse genoomi reparatsioonil (Raju jt., 1999). RNA-valk kompleksi moodustumisel on oluline roll nsP4 N-terminaalsel regioonil. Mutatsioonid selles piirkonnas vähendavad oluliselt sünteesitavate RNA-de hulka. Puhastatud kujul on nsP4 võimeline lisama adenosini jääke RNA substraadile (Rubach jt., 2009). Iseseisva valguna on nsP4 raku väga ebastabiilne ja lagundatakse kiiresti ubikvitiin-vahendatud proteolüüsil. Teiste

mittestruktuursete valkudega moodustab nsP4 replikatsioonikompleksi ning on sellisel juhul RNA sünteesi läbiviimiseks piisavalt stabiilne (de Groot jt., 1991).

#### **1.1.4. SFV infektsioonitsükkel**

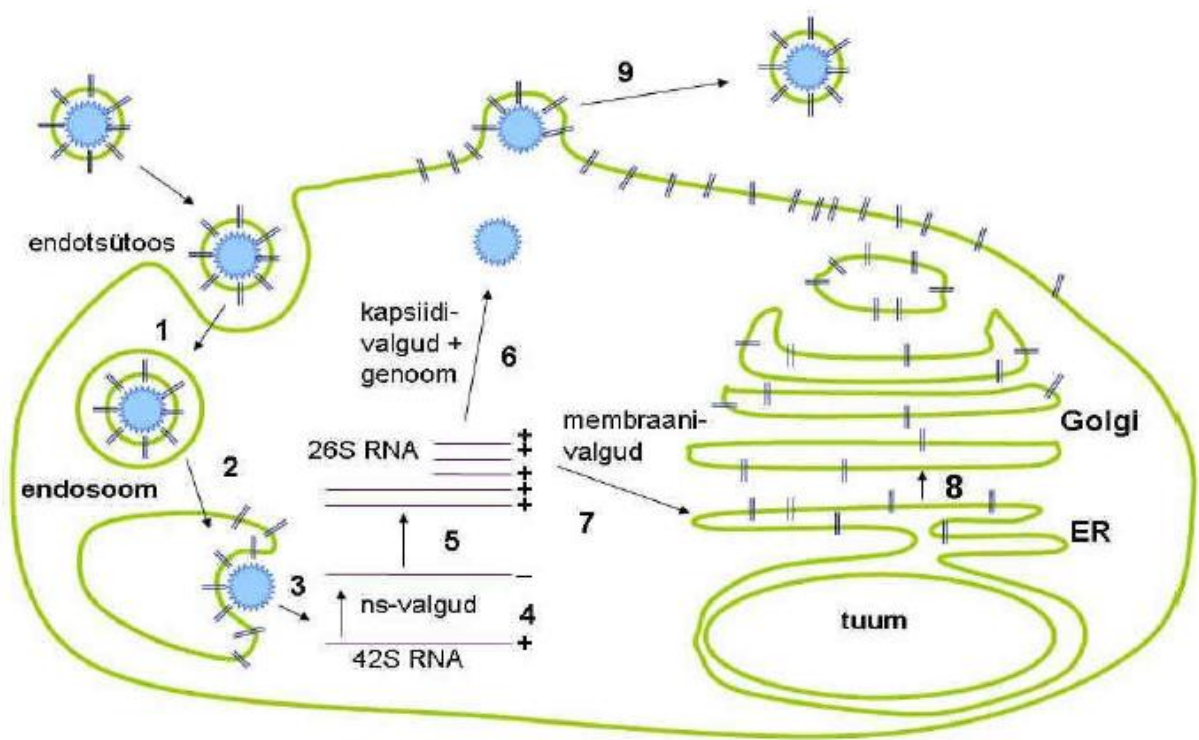
Virion kinnitub peremehe rakule E2 glükoproteiini vahendusel (Smith jt., 1995). Retseptor ei ole SFV puhul täpselt teada, kuid arvatakse, et neid on mitu, sest SFV suudab nakatada väga erinevad organisme ja rakutüüpe (Schleisinger ja Schleisinger, 2007). Rakku sisenemine toimub retseptorvahendatud endotsütoosi teel, mille käigus tekivad klatriiniga kaetud vesiikulid (Joonis 2) (Helenius ja Kartenbeck, 1980).

Moodustuvate endosoomide madal pH põhjustab E1-E2 dimeerides konformatsioonilised muutused, mille tagajärjel E1 vabaneb ja käivitab endosoomi ja viiruse membraanide ühinemise, mille tulemusena vabaneb nukleokapsiid raku tsütoplasmasse (Justman jt., 1993; Schuffenecker jt., 2006). Lisaks madalale pH-le vajavad osad alfaviirused (SFV, Sindbis viirus, CHIKV) membraanide ühinemise jaoks ka kolesterooli olemasolu (Bernard jt., 2010). Nukleokapsiidi lahtipakkimine toimub 1-2 minutit pärast virioni rakku sisenemist. Seda protsessi viivad läbi raku ribosoomid ja selle käigus eemaldatakse viiruse RNA küljest 80% nukleokapsiidi valkudest (Singh ja Helenius, 1992).

Peale lahtipakkimist transleeritakse genoomselt RNA-lt P1234 ja struktuurne polüproteiin (Joonis 3) (Glanville jt., 1976). Varajases infektsioonis katalüüsib nsP2 polüproteiini P1234 lõikamist P123 ja nsP4-ks (Takkinen jt., 1991), mis moodustavad ebastabiilse varajase replikaasi, mis sünteesib negatiivse polaarsusega RNA-d (Strauss ja Strauss, 1994). Kui polüproteiini on kogunenud piisavalt kõrges kontsentratsioonis, toimub P123 lõikamine ja moodustuvad nsP1, P23 ja nsP4: sellele järgneb otsekohe kolmas lõikamine, mille tulemuseks on nsP2 ja nsP3 valgud. Selle tagajärjel peatub negatiivse polaarsusega RNAde süntees ja moodustub stabiilne replikatsioonikompleks, mis hakkab transkribeerima genoomset 42S RNA-d ja SG 26S RNA-d (Sawicki ja Sawicki, 1980; Shirako ja Strauss, 1994).

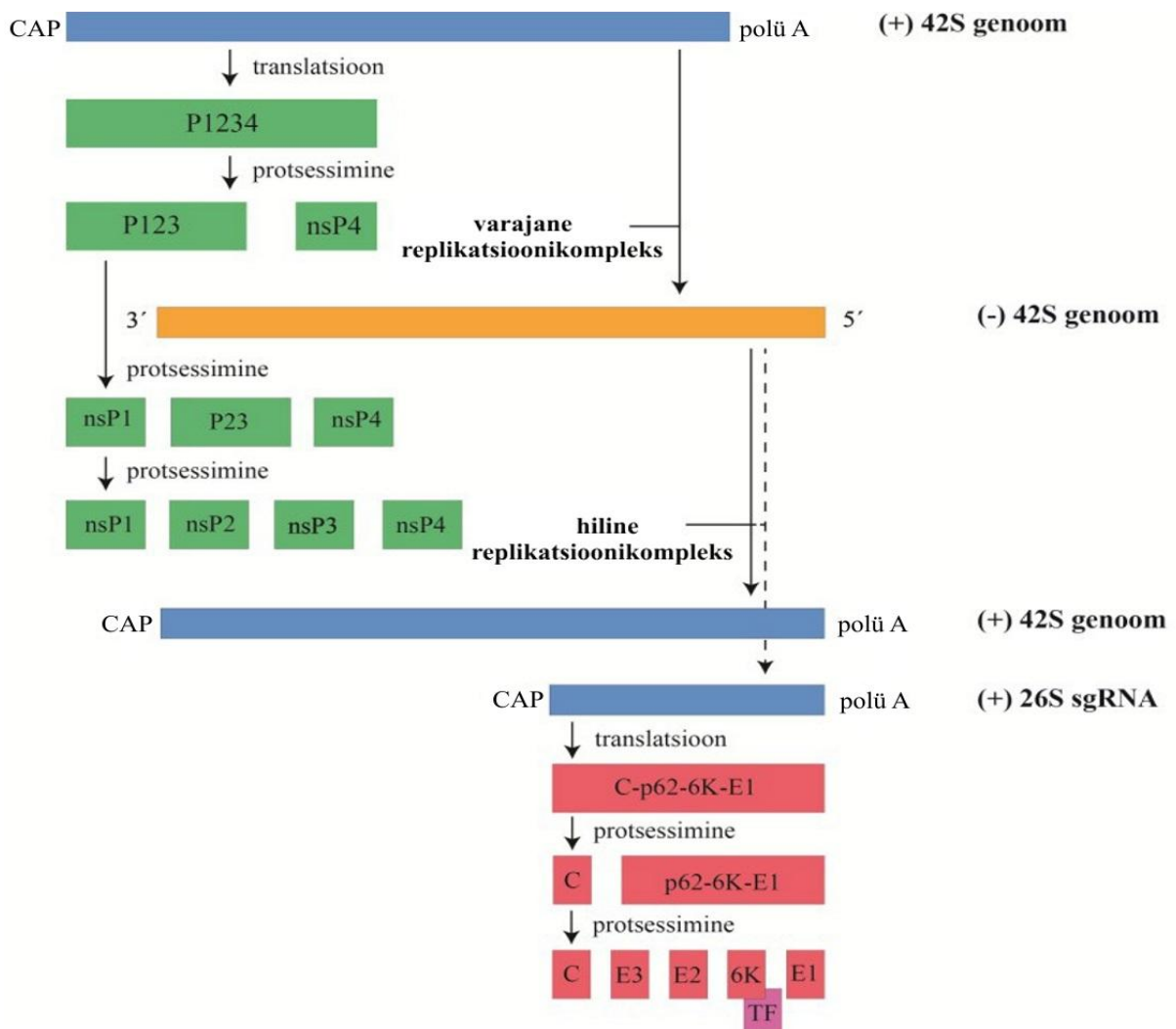
Struktuursete valkude lõikamine toimub kotranslatsiooniliselt. Kõigepealt lõikab kapsiidivalk ennast ülejäänud polüproteiini küljest lahti (Melançon ja Garoff, 1987). Pärast seda on kapsiidivalk võimeline ära tundma viiruse genoomset RNA-d ja sellega seondumine algatab nukleokapsiidi kokkupakkimise (Owen ja Kuhn, 1996).





**Joonis 2. Alfaviiruse replikatsioonitsükli ülevaade.** 1 – raku sisenemine retseptorvahendatud endotsütoosiga, 2 – nukleokapsiidi vabanemine tsütoplasmasse, 3 – nukleokapsiidi lahtipakkimine, 4 – negatiivse polaarsusega RNA süntees, 5 – genoomsete ja SG mRNA-de süntees, 6 – nukleokapsiidi moodustumine, 7 – membraanivalkude transport ER-i, 8 – membraanivalkude transport läbi Golgi kompleksi raku membraani, 9 – virioni vabanemine. (Tamm, 2006 modifitseeritud)

Allesjäänud polüpeptiid transporditakse tänu E3 valgus olevale signaaljärjestusele ER-i ja selle edasise protsessimise viivad läbi raku peptidaasid (Lobigs jt., 1990; Sanz jt., 2003). Kohe pärast sünteesi moodustavad p62 (E2-E3 eelvalk) ja E1 valgud omavahel heterodimeerid, mis transporditakse Golgi kompleksi kaudu raku membraani (Barth jt., 1995; Sariola jt., 1995). Transpordi lõpp-faasis toimub p62 lõikamine furiin-laadsete proteaaside poolt, mille tulemusena tekivad valmis E2 ja E3 valgud (Sariola jt., 1995). Selle tagajärjel toimuvad konformatsioonilised muutused (Wahlberg jt., 1989), mis lasevad kapsiidivalgul interakteeruda E2 valguga ja see omakorda algatab virionide pungumisprotsessi. Pungumise käigus saab nukleokapsiid omaale rakult membraani, milles paiknevad E1-E2 heterodimeerid (Vogel jt., 1986; Owen ja Kuhn, 1997). Vabanenud viiruspartiklid on võimelised nakatama uusi rakke (Strauss ja Strauss, 1994).



**Joonis 3. Skemaatiline ülevaade alfaviiruse genoomi replikatsioonist ning sellelt toimuvast translatsioonist koos valkude protsessimisega. (Ratnik, 2012 modifitseeritud)**

## 1.2. T7 AUTOGEENSÜSTEEM

Eukarüootses rakus paikneb DNAST sõltuv RNA polümeraas II raku tuumas; selle ensüümi kasutatavad promooterid on keerulise ehitusega ja neid iseloomustab keeruline regulatsioon. Mitmete viiruste, nagu sugukonda *Povoviridae* kuuluvate T7 ja SP6 bakteriofaagide transkriptsioonisüsteem on palju lihtsam: nende viiruste hiliste RNAd süntees toimub ühest polüpeptiidist koosneva RNA polümeraasi (RNAP) abil, mis tunneb ära väga lühikese, vaid 23-st nukleotiidijäägist koosneva promooteri. Selliste RNAP-de aktiivsus ei sõltu nende paiknemisest rakus, nad on aktiivsed ka rakuvabas keskkonnas. Viimast omadust kasutatakse laialdaselt molekulaarbioloogias erinevate RNAd sünteesimiseks.

Erinevalt faagide polümeraaside laialdasest kasutamisest rakuvabas keskkonnas on nende kasutamine eukarüootses rakus olnud suhteliselt tagasihoidlik. Autogeensüsteem ongi võõrgeenide ekspresseerimiseks loodud süsteem, milles on sellise viiruse RNAP-i kodeeriv järjestus paigutatud tema enda promooteri kontrolli alla. Sellise konstrukti viimine rakkudesse käivitab RNAP-i ekspressiooni amplifikatsiooni; selle protsessi reguleerimiseks lisatakse autogeenidele ka muid geneetilisi elemente, mis muudavad süsteemi lihtsamini kasutatavaks ja efektiivsemaks.

Teadlased kasutavad mitmeid süsteeme, kuidas võõrast DNA-d eukarüootsetesse rakkudesse viia ja seda seal ekspresseerida. Tavaliselt on selleks plasmiidne vektor, kuhu on sisestatud huvipakkuv geen. See, millise promooteri all geen on, dikteerib, kuidas ja millal geeni ekspresseeritakse (Chen jt., 1994). Seega, kui soovitakse ühte ja sama geeni ekspresseerida erinevates rakkudes on reeglina vaja konstrueerida mitmeid ekspressioonivektoreid. Probleemiks on kas asjaolu et „eksootilisemate“ rakkude kasutamisel (nt. moskiitode rakud) on efektiivsete promooterite järjestused ja nende aktiivsuste regulatsioon sageli teadmata. Täiendavaks probleemiks on osutunud DNA lokaliseerimine rakutuuma, sest koekultuuri rakke transfekterides jõuab sinna ainult mõni protsent ning elusatesse kudedesse veelgi vähem (Miller jt., 1990). Seetõttu on välja töötatud erinevaid süsteeme, kus DNA-d ekspresseeritakse tüstoplasmas, kus see püsib mitmeid kuid (Wolff jt., 1990). Üheks selliseks on taas T7 faagi RNAP-l põhinev süsteem: selleks kasutatakse rakke, kus stabiilselt sünteesitakse bakteriofaag T7 RNAP-i, mille ülesandeks on T7 promooteri all olevate geenide transkribeerimine (Gao ja Huang, 1993). Tänu sellele saab vältida T7 RNAP valgu viimist rakkudesse, mis on aeganõudev ja kulukas (Chen jt., 1995). Samas loob see aga ka olulise piirangu: süsteemi kasutamiseks on kõigepealt vaja valmistada vastavad T7 RNAPi ekspresseerivad püsiliinid. See on keeruline paljude koekultuuris kasvatavate rakkude puhul ja reeglina mitterakendatav elusate kudede ja primaarkultuuride puhul.

### **1.2.1. T7 RNA polümeraas**

Bakteriofaag T7 polümeraas on ühe sub-ühikuline DNA-st sõltuv RNA polümeraas, mis isoleeriti esmakordset 1969. aastal T7 faagiga nakatunud *Escherichia coli* (*E.coli*) rakkudest (Chamberlin jt., 1970). Ta koosneb 883 aminohappe jäägist ja tema molekulmass on 98 kDa. T7 polümeraasi RNA sünteesimise kiirus on umbes 100-200 nukleotiidi sekundis (Rusakova

jt., 1999) ning ta on kõrge spetsiifilisusega T7 promooteri suhtes ega vaja funktsioneerimiseks teisi valke (Tabor ja Richardson, 1985).

Struktuurilt on T7 RNAP sarnane ühe sub-ühikuliste DNA polümeraasidega, tal on peopesa, sõrmede ja pöidla domeenid (Joyce ja Steitsz, 1994). Pöidla domeeni peamine ülesanne on hoida polümeraasi DNA ahelal ning mutatsioonid selles piirkonnas vähendavad oluliselt polümeraasi protsessiivsust (Bonner jt., 1994). Peopesa domeenis paikneb polümeraasi aktiivtsenter, kus seotakse kaks  $Mg^{2+}$  iooni, mis katalüüsivad fosfodiestersideme moodustumist. Polümeraas ise ei võta aktiivselt osa sidemete moodustumises, vaid paigutab DNA ahela, Mg-ioonid ja NTP-d nii, et reaktsioon saaks toimuda (Steitz, 1998). Sõrmede domeen on väga mobiilne ja muudab iga NTP lisamisel konformatsiooni. Sõrmedel on avatud ja suletud asend. Avatud asendis on polümeraas katalüütiliselt inaktiivne ja võimeline mööda DNA ahelat edasi libisema. Kui tsentrisse satub õige NTP, lähevad sõrmed suletud asendisse ja polümeraas jääb DNA ahela suhtes paigale. Peale NTP lisamist sünteesitavale RNA ahelale lähevad sõrmed uuesti avatud asendisse ja tsükkel algab otsast peale (Doublie jt., 1998).

Lisaks on T7 RNAP-l veel N-terminaalne domeen, promooterit ära tundev *loop* ja C-terminaalne *loop*. N-terminaalne domeen painutab DNA-d ja avab promooteri nii, et see saaks seonduda promooterit ära tundva alaga (Ujvari ja Martin, 1997). Promooteri avamise eest vastutab lühike, 11 aminohappe jäägi pikkune  $\beta$ -juuksenõela struktuur (Brieba ja Sousa, 2001). Promooterit ära tundev *loop* on väga spetsiifiline T7 promooteri suhtes ja punktmutatsioonid selles piirkonnas muudavad polümeraasi spetsiifilisust (Raskin jt., 1992). RNAP-i C-terminaalne *loop* interakteerub T7 kodeeritud lüsotsüümiga, mis on vajalik T7 faagi infektsiooni lõpp-faasis transkriptsiooni inhibeerimiseks (Moffatt ja Studier, 1987).

### 1.2.2. Autogeensüsteemid

Autogeensüsteemides kasutatakse tihti T7 RNAP-i. T7 promooteri all olevate geenide ekspresseerimiseks eukarüooti rakus tuleb sinna sisestada T7 RNAP (valgu kujul) või T7 RNAP-i kodeeriv plasmiid või, nagu ülal kirjeldatud, kasutada rakuliine, kus stabiilselt ekspresseeritakse T7 RNAP-i (Chen jt., 1994).

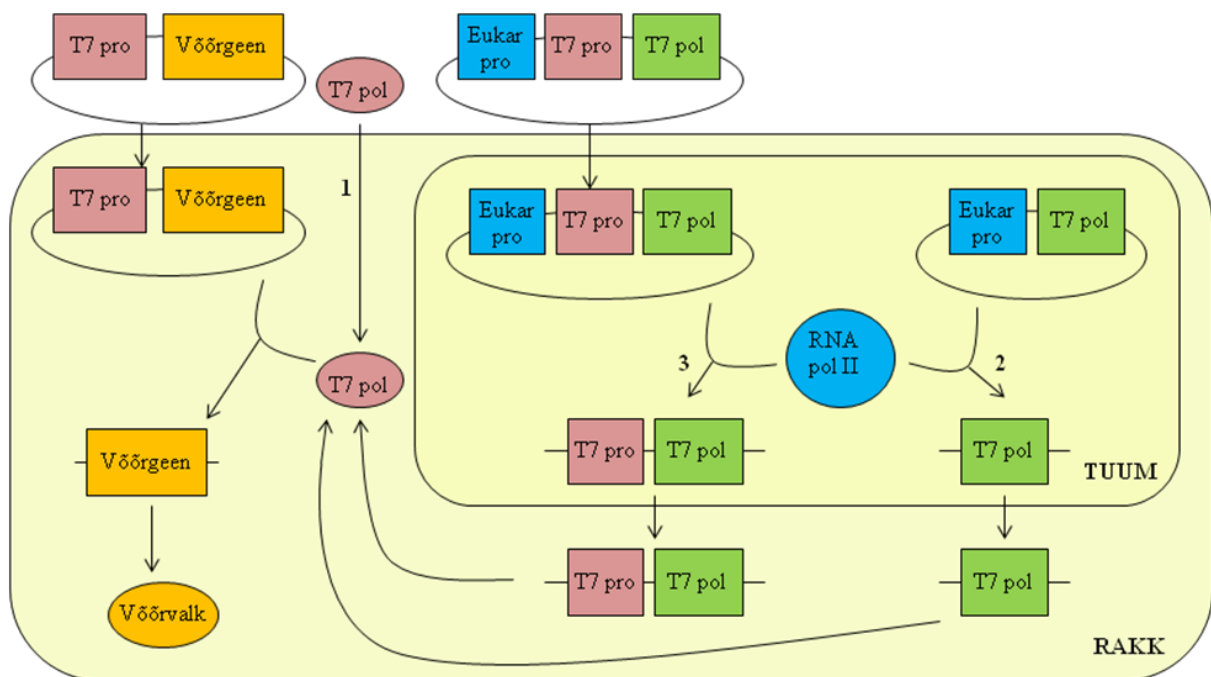
Reeglina tagavad sellised süsteemid T7 RNAP madala taseme rakkudes. See vähendab T7 promooteri kontrolli all olevate järjestuste ekspresseerimist. Sellest erinevalt on T7 autogeensüsteemil potentsiaal toota väga suures koguses valke, sest peale esialgset autogeeni

initsieerimist (esimeste T7 RNAP mRNAde süntees raku tuumas ja vastavate valkude translatsioon tsütoplasmas) algab positiivse tagasiside ring, mille tulemusena toodetakse üha rohkem T7 RNAP-i. Seda saab kasutada ka T7 promooteri all olevate geenide ekspresseerimise võimendamiseks (Dubendorff ja Studier, 1991). Saavutamaks süsteemi efektiivset käivitamist võib autogeeni plasmidi sisestada T7 promooteri ette ka mõne aktiivse eukarüootse promooteri, näiteks tsütomegaloviiruse (CMV) oma, millelt raku RNA polümeraas II on võimeline transkriptsiooni alustama. Sellisel juhul ei ole kaskaadi käivitamiseks vaja T7 RNAP-i (valgu kujul) rakkudesse viia, sest mingi osa rakku sisenenud eukarüootset promooterit sisaldavatest plasmiididest transporditakse tuuma, kus esmane transkriptsioon toimub raku ensüümide abil (Chen jt., 1995). Seda strateegiat saab efektiivselt kasutada jagunevates rakkudes, sest nendes on autogeeni plasmidi transport tuuma aktiivsem (Farrow jt., 2006).

Tsütoplasmas läbiviidava transkriptsiooni tulemusel sünteesitud RNA-l puuduvad eukarüootsele mRNAle iseloomulikud modifikatsioonid. Kui polü(A) järjestuse lisamine on lihtne (piisab vastava järjestuse paigutamisest plasmiidisse vektorisse), siis efektiivseid meetode, mis sobiksid sellistele RNA-dele 5'-*cap* struktuuride lisamiseks, ei tunta. Seetõttu kasutatakse T7 faagi RNAP-l põhinevate süsteemide efektiivsuse tõstmiseks sisemist ribosoomi seondumispiirkonda (IRES), mis tänu oma sekundaarstruktuurile suurendab oluliselt *cap*-struktuurita transkriptide translatsiooni. IRES struktuure on erinevat tüüpi. Putukarakkudes kasutatakse ditsistroviiruste struktuurse regiooni ees paiknevat IRES elementi, mis ei vaja oma toimimiseks mingeid translatsioonifaktoreid. Selgroogsete rakkudes toimivaid IRES elemente iseloomustab keerulisem toimimismehhanism. Lihtsustatult võib väita, et selline IRES lubab ribosoomi sub-ühikutel ja teistel translatsiooniks vajalikel valkudel transkriptiga õigesti interakteeruda (Jackson jt., 1994). Erinevad IRES-d on erineva efektiivsusega, üks kõige efektiivsemaid ja seetõttu biotehnoloogias enim kasutatavaid on hiirte entsefalomüokartiidi viiruse IRES (Finn jt., 2005).

Nagu ülal lühidalt välja toodud, saab T7 RNAP-i võõrgeenide ekspresseerimiseks kasutada mitmel viisil. Koos huvipakkuva plasmiidiga võib rakku sisestada eelnevalt puhastatud T7 RNAP-i, mis jääb tuuma lokaliseerimise signaali puudumise tõttu tsütoplasmasse ja hakkab seal soovitud RNA-sid tootma (Joonis 4, rada 1). Selline meetod pole aga väga efektiivne, sest raku viidud polümeraasi hakatakse seal ka lagundama (Gao ja Huang, 1993). Probleemi võimaldab lahendada ensüümi pidev juurdesüntees. Nii on Zheng jt. on loonud hamstri neerurakkude (BHK) liini, kus ekspresseeritakse pidevalt T7 RNAP-i. Kui sellistesse rakkudesse viia plasmid, mis sisaldab T7 promooterit, siis hakatakse seda transkribeerima ja

tootma huvipakkuvat valku (Joonis 4, rada 2) (Zheng jt., 2009). Siiski ei ole T7 RNAP aktiivsuse sellistes rakkudes kõrge. Seda saab aga oluliselt suurendada viies nendesse väga lihtsa autogeeni: plasmidi, milles T7 RNAP-i kodeeriv järjestus paikneb T7 promooteri kontrolli all. Paraku ei ole väga paljude erinevate T7 RNAP-i ekspresseerivate püsiliinide konstrueerimine praktiline ja nagu juba märgitud, võib see olla tehniliselt keeruline või isegi võimatu. Seepärast on uuemad autogeensüsteemid loodud nii, et lisaks polümeraasi geenile ja T7 promooterile on plasmidis ka eukarüootne promooter. Tänu sellele initsieerib süsteem ennast ise (Joonis 4, rada 3) (Chen jt., 1995).



**Joonis 4. Erinevad T7 autogeensüsteemid.** Rada 1 – rakku viiakse T7 RNAP (valgu kujul). Rada 2 – kasutatakse T7 RNAP-i ekspresseerivat rakuliini. Rada 3 – rakku viiakse plasmidi, milles on eukarüootne promooter, mis käivitab autogeensüsteemi. Kõikide radade lõpptulemuseks on T7 RNAP, mis transkribeerib rakku viidud võõrgeeniga plasmidilt mRNA, millelt sünteesitakse huvipakkuv võõrvalk. Joonise lihtsustamiseks ei ole näidatud autogeenide amplifikatsioonile viivat rada tsütoplasmas. (Autori koostatud)

Teadlased on konstrueerinud ja testinud mitmeid erinevaid T7 autogeensüsteeme. Üks esimestest oli Studieri pT7 AUTO 2C<sup>-</sup> (T7 polümeraas T7 promooteri kontrolli all), mille efektiivsust uurisid Gao jt. Reporterina kasutati pT7-EMC-CAT konstrukti, mis sisaldas T7 promooterit, entsefalomüokartiidi viiruse IRES-elementi ning klooramfenikooli atsetüültransferaasi (CAT). CAT-i ekspressioon oli detekteeritav juba 8 tundi pärast transfekteerimist ja püsis viie päeva jooksul stabiilselt kõrgel tasemel, kuid juba 24 tunni möödudes täheldati umbes 50%-l rakkudest tsütotoksilisi efekte (Gao jt., 1994).

Seda probleemi üritasid lahendada Brisson jt., kes konstrueerisid plasmidi pCMV/T7-T7pol, mis sisaldas lisaks ka CMV promooterit. Reporterina kasutasid nad samuti pT7-EMC-CAT-i. Nende autogeenisega saavutati kõrgem CAT-i ekspressiooni tase, mille haripunkt oli 5.-6. päeval, kuid püsis kõrgena vähemalt seitse päeva. Tsütotoksilist efekti need uurijad ei täheldanud (Brisson jt., 1999). IRES-elementi võtsid oma autogeenis kasutusele ka Deng ja Wolff ning see tõstis kordades süsteemi efektiivsust (Deng ja Wolff, 1994).

### **1.3. ALFAVIIRUSTE REPLIKONVEKTORSÜSTEEMID**

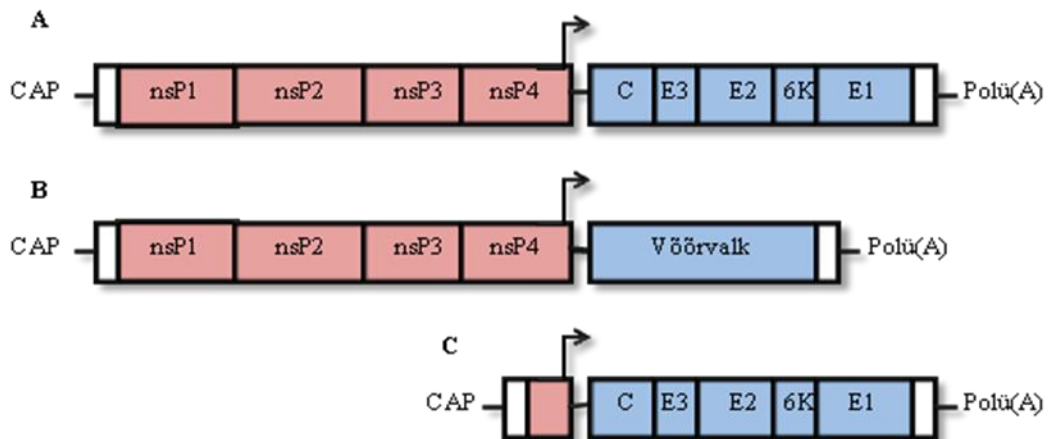
Alfaviiruste replikonvektoreid kasutatakse nii biotehnoloogias kui ka vastavate viiruste uurimise lihtsustamiseks ja ohutumaks muutmiseks. Replikon-*helper*-süsteemide abil saab toota VRP-sid, millega on sageli oluliselt mugavam ja ohutum töötada kui infektsiooniliste viirustega. Samuti on neid võimalik kasutada meditsiinis, näiteks geeniteraapias või vaktsineerimisel.

#### **1.3.1. Replikonide ja helperite ehitus**

Replikon on RNA, mis sisaldab viiruse mittestruktuurseid valke kodeerivaid järjestusi ja RNA replikatsiooniks ning SG RNA sünteesiks vajalikke elemente. SG promooteri alla on replikonvektorites viiruse struktuurseid valke kodeerivate järjestuste asemele paigutatud mõni reportergeen või mistahes muu huvipakkuvat valku kodeeriv järjestus (Joonis 5). Sellisel viisil konstrueeritud RNA-lt toodetakse viiruse replikaasi, mis paljundab replikonvektorit ja sünteesib huvipakkuva valgu mRNA ilma, et selle protsessi käigus moodustuksid viiruspartiklid ja toimuks infektsiooni levik (Frolov jt., 1996).

Samas on replikon paljas RNA, mis ise rakkudesse siseneda ei suuda. VRP-de tootmiseks tuleb replikonvektorit kasutada koos *helper*-vektoriga. *Helper*-vektoris on olemas viiruse struktuurseid valke kodeerivad geenid ning RNA replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikud elemendid. Kui rakku transfekteerida nii replikon- kui *helper*-RNA-d, toimub rakus infektsioonitsükkel, mille ainus erinevus normaalsest on see, et tekkivasse virioni ei pakita struktuursete valkude gene ehk *helper*-vektorit (viimases puudub signaal RNA pakkimiseks). Tekkinud VRP on sarnane virionile ja on võimeline nakatama uut rakku. Sellises rakus toimub taas replikon-RNA replitseerumine ja transkriptsioon, millega kaasneb replikonis

oleva reporteri (või muu valgu) ekspresseerimine; samas struktuursete geenide puudumise tõttu uusi partikleid ei moodustu (Frolov jt., 1996; Atkins jt., 1999).



**Joonis 5. Replikon- ja helper-vektorite ülesehitus.** A – alfaviiruse genoom. B – replikonvektor, milles on struktuursete valkude asemel võõrvalku (näiteks reporterit) kodeeriv järjestus. C – helper-vektor, milles on olemas viiruse struktuursete valkude geenid, kuid puudub enamus replikaasi kodeerivast järjestusest ja selles paiknev RNA pakkimisjärjestus. (Koostatud Atkins jt., 1999 järgi)



## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. TÖÖ EESMÄRGID

Töö eesmärgiks oli kasutada T7 autogeensüsteeme alfaviiruse genoomi, replikoni ja *helper*-RNA vabastamiseks infektsioonilise cDNA (kompelemntaarne DNA) kloonist. Ehkki T7 autogeene on kasutatud biotehnoloogias, pole seda seni tehtud viiruse vabastamiseks. Samas on tegemist perspektiivse lähenemisega, sest see võimaldaks viiruse või replikoni vabastamist rakkudes, mille jaoks puuduvad efektiivsed promooterid ja millesse on RNA-d raske transfekteerida (näiteks sääserakud).

Seoses lähenemise uudsusega on vastuseta mitmed võtmeküsimused. Esiteks pole teada, kas autogeeni saab üldse kasutada alfaviiruse RNA-de vabastamiseks rakus. Alfaviiruse RNA-d on *cap*-eeritud ja autogeen *cap*-struktuure sünteesida ei suuda. Kirjanduses on arvukalt andmeid, et alfaviiruse genoomid, millel puudub *cap*-struktuur, ei ole infektsioonilised. Samas on kaks töörühma hiljuti näidanud, et rakus T7 RNAP-i poolt sünteesitavad alfaviiruse mini-genoomid on replikatsioonivõimelised (Frolova jt., 2010; Spuul jt., 2011).

Teiseks ei ole teada kui efektiivne on alfaviirus-autogeen kombinatsioon. Eraldi võetuna on nii autogeen kui alfaviiruse vektorid väga efektiivsed ja seetõttu on võimalik, et kokku võivad nad moodustada väga tulemusliku kombinatsiooni. Samas ei saa välistada, et kaks tsütoplasmas toimivat väga aktiivset süsteemi on teineteise suhtes hoopis antagonistlikud ja üks nendest surub teise toimimise suuremal või vähemal määral maha. Töö praktiliseks eesmärgiks oli ka uurida, kas autogeene saab kasutada SFV VRP-de tootmiseks, vältides seejuures kulukat *in vitro* RNA-de sünteesi.

Antud töös katsetati kahte erineva T7 autogeensüsteemi ja T7-BHK rakuliini. Üks autogeenidest oli kavandatud ja konstrueeritud Age Utti poolt. Teine, isekäivituv autogeen, oli kavandatud Aleksei Lulla ja konstrueeritud Viktoria Shypi poolt.

## 2.2. MATERJALID JA MEETODID

### 2.2.1. Bakteritüved ja söötmed

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *E.coli* tüve XL10. Bakterit kasvatati LB vedel- või tardsöötmel (10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl (pH 7.0)), kuhu oli lisatud ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml või kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Transformatsioonil kasutatavaid rakke kasvatati SOC söötmes, mis valmistati SOB söötimest (20 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 0.5 g/l NaCl, 2.4 g/l MgSO<sub>4</sub>, 186 mg/l KCl) glükoosi lisamisega lõppkontsentratsiooniga 20mM.

### 2.2.2. Plasmiidid

**pT7-Lac-IRES-T7pol** – sisaldab ampitsilliini resistentsusgeeni, bakteriofaag T7 polümeraasi promooterit, Lac-operaatori järjestust, entsefalomüokartiidi viiruse IRES elementi ning looduslikku T7 RNAP-i kodeerivat järjestust. Plasmiid on konstrueeritud Age Utti poolt.

**pGL4-mEF1a-T7auto** – sisaldab ampitsilliini resistentsusgeeni, mEF1a promooterit (hiire elongatsioonifaktor-1 alfa promooter), intronit, bakteriofaag T7 polümeraasi promooterit, Lac-operaatori järjestust, entsefalomüokartiidi viiruse IRES elementi ning koodon-optimeeritud (inimese koodonkasutusele) T7 RNAP-i kodeerivat järjestust. Plasmiid on konstrueeritud Viktoria Shypi poolt.

**pT7-SFV4-nsP3-ZsGreen** – sisaldab ampitsilliini resistentsusgeeni, bakteriofaag T7 polümeraasi promooterit ja modifitseeritud SFV4 (Semliki Forest viiruse tüvi 4) cDNA-d, kus nsP3 valku kodeerivasse järjestusse on lisatud roheliselt fluoreseeruvat markerit (ZsGreen) kodeeriv järjestus. Plasmiid on konstrueeritud Aleksei Lulla poolt.

**pCMV-SFV4** – sisaldab kanamütsiini resistentsusgeeni, CMV promooterit, SFV4 infektsioonilist cDNA-d, millesse on lisatud intron-järjestus ja hepatiit D viiruse ribosüümi järjestusele vastavat cDNA-d. Plasmiid on konstrueeritud Liane Viru poolt.

**pT7-SFV-Repl-SG-mCherry** – sisaldab ampitsilliini resistentsusgeeni, bakteriofaag T7 polümeraasi promooterit, SFV replikoni infektsioonilist cDNA-d, mille SG promooteri alla on paigutatud punaselt fluoreseeruvat markerit (mCherry) kodeeriv järjestus. Plasmiid on konstrueeritud Aleksei Lulla poolt.

**pT7-SFV-Repl-PG-SG-mCherry** – Eelmise mutantne variant, replikoni cDNA-sse on viidud mutatsioon mis vahetab replikoni nsP2 valgus aminohappe jäägi 718 proliin glütsiini vastu. Plasmiid on konstrueeritud Aleksei Lulla poolt.

**pT7-SFV-SG-Helper** – sisaldab ampitsilliini resistentsusgeeni, bakteriofaag T7 polümeraasi promooterit ja SFV *helper*-RNA cDNA-d. Plasmiid on konstrueeritud Aleksei Lulla poolt.

**pT7-SFV-2A-Helper** – Eelmise variant, milles *helper*-RNAs paiknev SG promooter on eemaldatud ja nsP1 lugemisraami algus on liidetud struktuursete valkude lugemisraamile. NsP1 N-terminust kodeeriva järjestuse ja kapsiidivalgu kodeeriva järjestuse vahele on paigutatud suu- ja sõrataudi viiruse (FMDV) 2A autoproteaasi kodeeriv järjestus. Plasmiid on konstrueeritud Aleksei Lulla poolt.

### 2.2.3. DNA puhastamine ja analüüs

Olemasolevate plasmiidide paljundamiseks transformeeriti nendega *E. coli* kompetentseseid rakke kuumašoki meetodil (2 min, 42°C). Plasmiidne DNA eraldati bakteritest mini- või midipreparatsioonil (NucleoBond® Xtra Midi EF). Plasmiidide õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsi ja sekveneerimisega. Sekveneerimistulemusi kontrolliti programmiga BioEdit.

### 2.2.4. Rakuliinid ja söötmed

Käesolevas töös kasutati hamstri neerurakkude liine BHK-21 ja T7-BHK rakuliini, mis ekspresseerib bakteriofaag T7 RNA polümeraasi (BSR-T7 rakud, Buchholz jt., 1999). BHK-21 rakke kasvatati GMEM söötmes (*Glasgow Modified Eagle's Medium*), millele oli lisatud 5% FCS-i (*Fetal Calf Serum*), 2% TPB-d (*Bacto™ Tryptose Phosphate Broth*), 200 mM Hepes (pH 7,2), penitsilliini 100 U/ml ja streptomütsiini 100 µg/ml. T7-BHK rakkude söötmele lisati veel antibiootikum G418 lõppkontsentratsiooniga 1 mg/ml. Rakke kasvatati 37°C inkubaatoris, mis hoiab kõrget niiskuse ja 5%-list CO<sub>2</sub> taset.

### 2.2.5. DNA transfektsioon BHK-21 ja T7-BHK rakkudesse

Plasmiidse DNA transfekteerimiseks rakkudesse kasutati elektroporatsiooni meetodit. 100 mm läbimõõduga tassidel kasvanud rakukultuuri pesti PBS-ga (*Phosphate Buffered Saline*, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4); seejärel eemaldati

rakud tassilt trüpsiiniga, koguti GMEM söötmesse ja sadestati tsentrifuugimisel 1000g juures 5 minuti jooksul. Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti vajalikus koguses GMEM söötmes. 250 µl rakususpensiooni segati vajaliku koguse DNA ja 50 µg *carrier*-DNA-ga (lõhe spermi DNA). Elektroporatsiooniks kasutati 0,4 cm elektroodide vahega küvetti ja Bio-Rad elektroporaatorit (üks pulss 220 V ja 975 µF juures). Poreeritud rakud tõsteti GMEM söötmega 15 ml koekultuuri topsi, sadestati tsentrifuugimisega (1000g, 5 minutit), resuspendeeriti GMEM söötmes ning külvati tassile.

#### **2.2.6. VRP-de tootmine**

VRP-de tootmiseks kotransfekteeriti pT7-SFV-Repl-SG-mCherry või pT7-SFV-Repl-PG-SG-mCherry replikon koos T7-SFV-SG-*Helper* või T7-SFV-2A-*Helper*-iga T7-BHK rakkudesse; BHK-21 rakkude transfekteamiseks lisati plasmiidide segule ka pGLM-mEF1a-T7auto plasmiid. Transfekteamitud rakke hoiti umbes 72 tundi 37°C juures 5% CO<sub>2</sub> tingimustest. Seejärel koguti rakkudelt sööde, mida tsentrifuugiti 15 minutit 4000 g juures, et eemaldada söötmes olevad rakud. Supernatant tõsteti uude katseklaasi ja säilitati -80°C juures.

#### **2.2.7. VRP-de tiiterdamine**

VRP-de tiitri määramiseks kasutati 6-augulisi plaate (augu läbimõõt 35mm), millel kasvatati BHK-21 rakukultuuri umbes 90-100% konfluentsuseni. VRP-de preparaat kontsentreeriti firma „Millipore“ Amicon Ultra 15 kolonnis, mis jätab suspensiooni ainult 100 kDa-st suuremad valgud. Uuritavatest VRP-dest tehti seerumvabasse GMEM söötmesse seeriaviisilised lahjendused ( $10^{-1}$  kuni  $10^{-6}$ ), millest nakatamiseks kasutati 200 µl. Rakke inkubeeriti nakatamissöötmega 1 tund 37°C ja 5%-lise CO<sub>2</sub> juures iga 10 minuti tagant plaati loksutades. Seejärel lisati rakkudele seeruminivaba GMEM söödet ja inkubeeriti 37°C ja 5%-lise CO<sub>2</sub> tingimustel. 8-12 tunni pärast loendati fluoresseeruvad rakud mikroskoobi abil.

#### **2.2.8. Western blot analüüs**

BHK-21 rakke nakatati VRP-dega ja infektsioonilise SFV-ga ning umbes 20 tunni pärast lüüsi rakud ühekordses Laemmli puhvris (50 mM TrisHCl, 100 mM DTT, 2% naatriumdodetsüülsulfaat (SDS), 0,1% broomfenoolsinine, 10% glütserool) ning valgud denatureeriti 95°C juures 5 minuti jooksul. Valkude lahutamiseks kasutati 10%-list polüakrüülamiidgeeli (10% SDS, 1,5 M Tris pH 8,8), elektroforees viidi läbi 1x SDS

jooksupuhvris Bio-Rad MiniProtein II seadet kasutades. Negatiivseks kontrolliks kasutati nakatamata rakkude lüsaati. Molekulmassi võrdluseks kasutati Thermo markereid (#26612 ja #26616). Lahutatud valgud kanti üle nitrotselluloosfiltrile („Amersham”, Hybond™-ECL™). Ülekanne toimus Bio-Rad poolkuiva ülekande aparaadis *semi-dry* puhvris (39 mM glütsiin, 48 mM Tris, 0,037% SDS, 20% metanool) 45 minutit 12 V juures. Seejärel blokeeriti membraan 1 tund toatemperatuuril loksutil 5%-lises lõssilahuses (5% lõssipulber, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween20). Pärast seda inkubeeriti membraani üleöö 4°C juures 2%-lises lõssilahuses, kuhu oli lisatud primaarsed huvipakkuvad antikehad. Membraan pesti 3x10 minutit loksutil *Western blot*-i pesulahuses (50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween20). Seejärel inkubeeriti membraani loksutil 2%-lises lõssilahuses, kuhu oli lisatud sekundaarne antikeha (peroksüdaasiga konjugeeritud küüliku IgG vastane kitse antikeha). Membraan pesti uuesti 3x10 minutit loksutil *Western blot*-i pesulahuses. Signaal detekteeriti kasutades *ECL™ Kit*-i („Amersham Pharmacia Biotech”) ja eksponeeriti röntgenfilmile.

#### **2.2.9. Viiruse tootmine ja infektsioonitsentrite test (ICA)**

BHK-21 rakkudesse ( $\sim 6 \times 10^6$  rakku) sisestati elektroporatsiooni teel 5 µg viiruse plasmiidset DNA-d (220 V, 975 µF, 1 pulss). Transfekteeritud rakkudest kasutati 10% lahjenduste tegemiseks seerumivabas söötmes. Ülejäänud suspensioonis sadestati rakud tsentrifuugimisel 1000g juures 5 minuti jooksul, resuspendeeriti GMEM söötmes ja pandi viiruse paljundamiseks söötmega tassile. 24-36 tunni pärast koguti tassil olev sööde 15 ml koekultuuri topsi, tsentrifuugiti ja viirust sisaldav supernatant tõsteti puhtasse katsekaasi, mida säilitati -80°C juures.

Transfekteeritud rakkude lahjendusi kasutati koheselt infektsioonilisuse määramiseks. Selleks kasvatati eelnevalt BHK-21 rakke 6-augulistel plaatidel umbes 90-100% konfluentsuseni. Rakke pesti PBS-iga ja nakatati 1 ml lahjendusseeriast pärinevate rakususpensioonidega. Plaat inkubeeriti 2 tundi 37°C ja 5%-lise CO<sub>2</sub> tingimustes, mille jooksul transfekteeritud rakud kinnituvad ettekasvatatud rakkudele. Seejärel eemaldati rakkudelt sööde ja lisati 2 ml segu, mis sisaldas 3 mahtu 2% seerumiga GMEM söödet ja 2 mahtu karboksümetüülselluloosi (CMC) 2% lahust steriilses vees. Rakke inkubeeriti 72 tundi 37°C ja 5%-lise CO<sub>2</sub> tingimustes ning värviti seejärel kristallviolett-fikseerimislahusega (0.25% kristallviolett („Merck“), 1.85% formaldehüüd, 100% etanool, 35 mM Tris, 0.5% CaCl<sub>2</sub>) 30 min jooksul. Selline segu värvib ainult elusaid rakke, surnud rakud jäävad värvituks. Seejärel

pesti tassid veega, kuivatati, loendati lüüsilaigud ja arvutati nende järgi viiruse infektsioonilisus.

#### **2.2.10. Viiruse tiiterdamine**

Viiruse tiitri määramiseks kasvatati eelnevalt BHK-21 rakke 6-augulistel plaatidel. Viirusest tehti vajalikud lahjendused seerumivabasse söötmesse. Rakud pesti PBS-iga ja nakatati 200 µl viiruse suspensiooniga. Rakke inkubeeriti 1 tund 37°C ja 5%-lise CO<sub>2</sub> juures iga 10 minuti tagant plaati loksutades. Seejärel lisati rakkudele CMC ja GMEM segu (2 osa 2%-list CMC-d + 3 osa 2%-list seerumit sisaldavat GMEM-i). Rakke inkubeeriti 72 tundi 37°C ja 5%-lise CO<sub>2</sub> tingimustes ning värviti seejärel kristallvioletiga ja loendati lüüsilaigud. Tiiterdamisi tehti kahes korduses.

### **2.3. TULEMUSED JA ARUTELU**

Teadlased kasutavad võõrgeenide rakkudes ja kudedes ekspresseerimiseks mitmeid erinevaid meetodeid. Üheks selliseks on T7 autogeensüsteem, millega töötamine on lihtne ja odav. Pidevalt luuakse uusi ja efektiivsemaid süsteeme, mida oleks veel mugavam kasutada. Selleks kombineeritakse omavahel erinevatest organismidest ja viirustest pärinevaid DNA elemente, mis mõjutavad autogeensüsteemi plasmidi lokalisatsiooni, stabiilsust ning transkriptsiooni ja translatsiooni initsiatsiooni.

Käesolevas töös kasutatakse kahte erinevat T7 autogeensüsteemi. Esimene neist on pT7-Lac-IRES-T7pol. IRES-element võimendab *cap*-struktuurita transkriptide translatsiooni eukarüootse raku tsütoplasmas ning eelnevad katsed on näidanud, et just entsefalomüokartiidi viiruse IRES on selleks ülesandeks kõige sobivam (Finn jt., 2005). Paraku sisaldab see IRES järjestus ka elemente, mis *E. coli* rakkudes toimivad nõrkade promooteritena. See toob kaasa soovimatuid tagajärgi – sellistelt transkriptidelt sünteesitakse T7 RNAP, mis käivitab autogeeni ekspressiooni tsükli juba bakteris; see on bakterile kahjulik ning rakud, milles autogeen käivitub, surevad. Kuna IRES järjestuse muutmine vähendaks (või isegi blokeeriks) tema aktiivsust, siis tuleb autogeeni aktivatsiooni vältimiseks kasutada teistsugust lähenemist. Üheks võimaluseks, mida kasutati mõlemas selles töös uuritud autogeenis, on Lac-operaatori kasutamine. Lac-operaator on DNA lõik, millele seondub Lac-repressor valk; selline seondimine blokeerib transkriptsiooni. Lac-operaator järjestus paigutati T7 RNAP-i promooteri järele. See ei takista küll krüptilist transkriptsiooni IRES järjestuses paiknavatelt

promooteritelt, kuid blokeerib transkriptsiooni T7 RNAP promooterilt, st ei lase ekspressioonil amplifitseeruda. Eukarüootses rakus see element ekspressiooni ei takista, sest nendes rakkudes puudub lac-repressor. Antud autogeeni tuleb eukarüootses rakus aktiveerida T7 RNAP-ga ja seetõttu kasutati seda T7-BHK rakuliinis.

Teine kasutatud autogeen on pGL4-mEF1a-T7auto, mis lisaks esimesele sisaldab tugevat närilise rakkudest pärinevat mEF1a promooterit. Promooterile järgneb intron ja T7 autogeeni kassett, mis on sarnane pT7-Lac-IRES-T7pol plasmiidis olevale, välja arvatud, et geeniekspressiooni võimendamiseks on T7 RNAP-i kodeeriv järjestus optimeeritud vastavalt inimese koodonkasutusele. Kuna mEF1a promooter tuntakse ära raku RNA polümeraas II poolt, ei ole seda süsteemi vaja eraldi aktiveerida. Koodonoptimeeritud T7 RNAP-i kodeeriv järjestus tagab ka plasmidi suurema stabiilsuse *E. coli* rakkudes, sest nendes rakkudes see efektiivseks translatsiooniks ei sobi (vähendab soovimatut T7 RNAP-i sünteesi).

Süsteemide efektiivsuse hindamiseks viidi autogeeni sisaldavatesse rakkudesse SFV genoomi ja replikonvektorsüsteemi järjestustele vastavaid cDNA-sid (mis on paigutatud T7 RNAP-i promooteri alla) sisaldavad plasmiidid. Sellised on pT7-SFV-Repl-SG-mCherry ja pT7-SFV-Repl-PG-SG-mCherry replikonide, pT7-SFV-SG-*Helper* ja pT7-SFV-2A-*Helper helper*-ite cDNA järjestusi sisaldavad plasmiidid ning viiruse cDNA järjestusi sisaldav pT7-SFV4-nsP3-ZsGreen. Plasmidi olid eelnavalt valmistatud tööruhma erinevate liikmete poolt, selleks tööks neid paljundati ja puhastati; saadud materjalide õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsi ja sekveneerimisega, mis näitasid, et tegu oli soovitud konstruktidega.

Eukarüootses rakus replitseeruvad kõige paremini SFV wt replikonid. Mutantsete replikonide võime iseennast paljundada ja eriti VRP-sid toota on tunduvalt madalam; eriti iseloomustavad sellised omadused antud töös kasutatud PG mutatsiooni sisaldavaid replikone (Tamm jt, 2008). Sellist replikoni kasutades saadakse VRP-sid umbes 50 korda vähem kui wt-replikoniga. Samas on taolise mutatsiooniga genoomi sisaldavad replikonid kasulikuks töövahendiks. Analüüsid näitavad, et PG mutatsioon takistab eriti tugevalt struktuurset valke kodeeriva SG RNA sünteesimist *helper*-RNAlt. Seepärast püstitati hüpotees, et sellise replikoni kasutamisel *helper*-RNAga, milles SG promooter on eemaldatud ja struktuursete valkude ekspressioon toimub otse *helper*-RNAlt, võib võimaldada efektiivsemat VRP-de tootmist. Siin on aga probleemiks asjaolu, et *helper*-RNAs ei ole struktuurset valke kodeeriv lugemisraam 5'-otsast lugedes esimene. Seda tingib asjaolu, et osa replikatsiooniks vajalikke *cis*-järjestusi paikneb nsP1 valku kodeerivas alas. Nii on *helper* RNA 5'-otsas (ülalpool struktuurse regiooni initsiaatorset koodonit) arvukalt AUG koodoneid; neist üks, nsP1 valgu

AUG koodon, paikneb tugevas kontekstis. Varasemad tööd on näidanud, et nende koodonite muteerimine muudab *helper*-RNA replikatsiooni ebaefektiivseks (Age Utt, avaldamata andmed). Seetõttu kasutati alternatiivset lähenemist.

Translatsiooni alguspunktiks valiti nsP1 valgu AUG koodon; SG promooteri deleteerimise tulemusena liideti nsP1 valgu lugemisraami ots struktuursete valkude lugemisraamile. See peaks võimaldama vastava liitvalgu translatsiooni. Paraku kaasneb sellega ka soovimatu efekt – viiruse kapsiidivalgu N-terminusse lisandub 77 nsP1 valgu N-terminusest pärinevat aminohappe jääki. Kuna selline lisand muudab kapsiidivalgu mittefunktsionaalseks, kasutati sellest vabanemiseks 2A autoproteaasi tehnoloogiat. 2A autoproteaas on pärit FMDV-st. See on 17-19 aminohappejäägi pikkune järjestus FMDV polüproteiinis, mis lõikab ennast ülejäänud ahela küljest lahti nii, et jätab enda järel olevale valgule ühe proliinijäägi NH<sub>2</sub>-terminaalsesse otsa (Robertson jt., 1985; Ryan jt., 1991). Selle efektiivsust on eelnevalt edukalt testitud alfaviiruste replikoni *split-helper* süsteemides, kus 2A autoproteaas eemaldab ogalaadseid struktuure moodustavate valkude küljest kapsiidi translatsiooni *enhancer*-järjestuse. See aitab ogadel moodustuda ilma ruumiliste takistusteta ja võimaldab saada kuni 10 korda suurema VRP-de tiitri, kui wt *helper*-iga (Smerdou ja Liljeström, 1999). pT7-SFV-2A-*Helper*-is SG promooterjärjestust ei ole ja seetõttu võib arvata, et rakus ekspresseeritakse rohkem struktuurseid valke kui pT7-SFV-SG-*Helper*-i puhul; ebasobiva nsP1 N-terminusest pärineva järjestuse eemaldab kapsiidivalgult 2A autoproteaas. Siiski jääb kapsiidivalgu N-otsa 2A järjestusest pärinev proliini jääk, mille mõju SFV VRP-de moodustamisele ei ole teada (muude alfaviiruste puhul on see kas vähene või puudub üldse).

Lugemise ja arusaamise hõlbustamiseks kasutatakse edaspidi konstruktide täisnime asemel lühendeid, mis on välja tootud allolevas tabelis. SFV konstruktide puhul kasutatakse neid nimetusi nii plasmiidide (mis sisaldavad viiruse/replikoni cDNA-sid) kui ka rakus replitseeruvate genoomide/replikonide (RNA-d) tähistamiseks.

**Tabel 1. Töös kasutatavad konstruktid koos vastavate lühenditega.**

Konstrukti nimi	Lühend
pT7-SFV-Repl-SG-mCherry	wt-replikon
pT7-SFV-Repl-PG-SG-mCherry	PG-replikon
pT7-SFV-SG- <i>Helper</i>	SG- <i>helper</i>
pT7-SFV-2A- <i>Helper</i>	2A- <i>helper</i>
pT7-Lac-IRES-T7pol	T7auto
pGL4-mEF1a-T7auto	mEF1a-T7auto
pT7-SFV4-nsP3-ZsGreen	T7-SFV
pCMV-SFV4	CMV-SFV



Käesolevas töös valmistati VRP-sid kahel erineval viisil. Esimesel korral testiti, kas T7-BHK rakuliini abil on võimalik VRP-sid toota, transfekterides nendesse T7 promooteri kontrolli all olevaid cDNA-sid. Selle jaoks poreeriti rakkudesse järgmised plasmiidide kombinatsioonid:

A. wt-replikon + *SG-Helper*

B. wt-replikon + *2A-Helper*

C. PG-replikon + *SG-Helper*

D. PG-replikon + *2A-Helper*

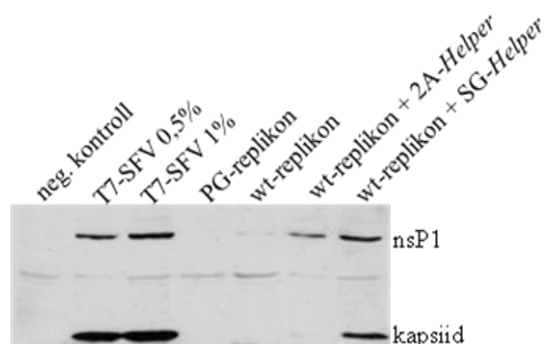
Kontrolliks poreeriti rakkudesse ka replikonide plasmiidid ilma *helper*-järjestusi sisaldavate plasmiidideta.

Saadud tulemused näitasid, et kombinatsioonide C ja D puhul oli saadud VRP-de tiiter nii madal, et jäi alla detekteerimispiiri. Järelikult ei ole võimalik BHK-21 rakke PG-replikoni ja *2A-Helper*-i cDNA-sid sisaldavate plasmiididega transfekterides VRP-sid toota. Üheks põhjuseks võib olla PG mutatsiooni väga tugev mõju, mis ei lase sünteesida VRP-de kokkupanekuks piisavas koguses struktureid valke. Teine põhjus, mida kinnitavad ka järgnevad tulemused, on see, et replitseeruvate RNA-de vabanemine cDNA-sid sisaldvatest plasmiididest on T7-BHK rakkudes väikese efektiivsusega. Nii täheldati kombinatsioonide A ja B puhul küll mCherry ekspressiooni transfekteritud rakkudes, kuid selliseid rakke oli suhteliselt vähe (alla 1% rakkudes, siinkohal on vaja märkida, et kui neid rakke transfekterida vastavate *in vitro* sünteesitud RNAdega on mCherry positiivsed > 95% rakkudest). Pikemal inkubeerimisel täheldati mCherry signaali levimist naaberrakkudesse ning tsütopaatilist efekti. See võib tuleneda VRP-de moodustamisest transfekteritud rakkudes, nende väljumisest ja naaberrakkudesse sisenemisest. Samas võib see tähendada ka seda, et *helper*-i ja replikoni vahel on toimunud rekombinatsioon, mis on viinud paljunemisvõimelise viiruse moodustamisele.

Järgnevalt kontrolliti viiruse valkude ekspressiooni transfekteritud rakkudes *Western blot* meetodil, täpsemalt analüüsiti SFV nsP1 ja kapsiidivalgu olemasolu (Joonis 6). Kuna need valgud on erinevate mõõtmetega, saab neid analüüsida samas geelis. Positiivse kontrollina kasutati viirusega (T7-SFV) nakatatud rakkude lüsaati. Kuna selles proovis olid kõik rakud nakatunud (võrrelduna 1% nakatatud rakkudega replikon + *helper* kombinatsiooniga transfekteritud rakkudes), kasutati võrreldavate signaalide saamiseks vastavat lüsaati 100-

või 200-kordses lahjenduses. Negatiivse kontrollina kasutati transfekteeerimata rakkude lüsaati.

Läbiviidud analüüs näitas et, nagu võis eeldada, ei leidunud rakkudes, mida poreeriti ainult wt- või PG-replikoniga, kapsiidivalgu, sest vastavat valku kodeerivad järjestused on olemas vaid *helper*-konstruktid. Peale selle ei leitud PG-replikoniga transfekteeeritud rakkudes ka nsP1-te, milles saab järeldada, et nsP1 valku (ja järelikult ka ülejäänud replikaasi valke) ekspresseeriti nendes rakkudes väga madalal tasemel. Wt-replikoniga transfekteeeritud rakkudes on nsP1 detekteeritav, mis näitab, et rakkudes toimus replikoni RNA vabanemine. Kuna vabanemise osas on wt- ja PG-replikonid identsed (vahe on vaid punktmutatsioon nsP2 valgus, mis vabanemist ei mõjuta), siis võib järeldada, et erinevus peab tuleneva wt-RNA oluliselt efektiivsemast replikatsioonist. Wt-replikon + 2A-*Helper*-iga transfekteeeritud rakkude lüsaadis on näha nsP1 valku ja lisaks sellele ka väikeses koguses kapsiidivalgu. NsP1 valgu suurem hulk tuleneb tõenäoliselt VRP-de moodustamisest ja naaberakkude nakatamisest nende poolt. Madal kapsiidi valgu hulk aga viitab sellele, et subgenoomse promooterita *helper*-RNA pealt on kapsiidivalgu süntees vähe-efektiivne. Seda arvamust kinnitavad ka wt-replikon + SG-*Helper*-iga nakatatud rakkude lüsaadi analüüsi tulemused: selles lüsaadis on selgelt näha mõlemad valgud. Eriti suur on vahe kapsiidivalgu ekspressioonis (Joonis 6). Sellel võib olla kaks võimalikku seletust: esiteks, nagu ülal öeldud, võib kapsiidivalgu ekspressioon olla SG promooteriga *helper*-RNA-delt oluliselt efektiivsem. Teine võimalus on see, et siin on replikon ja *helper* rekombineerunud paljunemis- ja levikuvõimeliseks viiruseks. 2A-*helper*-i kasutamisel on selline rekombinatsioon palju vähem tõenäoline, sest 2A-*helper*-is puudub efektiivseks rekombinatsiooniks oluline SG-promooteri järjestus.



**Joonis 6.** T7-BHK rakkudesse transfekteeeriti T7-SFV ja replikonid koos *helper*-itega. Rakud lüüsi umbes 20 tunni pärast ning valgud lahutati geel-elektroforeesil. Kapsiidi ja nsP1 vastaste antikehadega detekteeriti nende valkude olemasolu transfekteeeritud rakkudes.

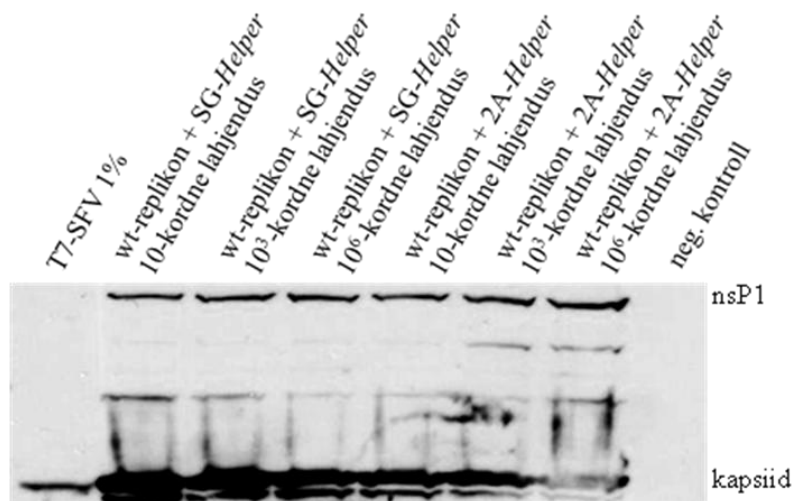
Teist korda toodeti VRP-sid testimaks mEF1a-T7auto konstrukti. Selle jaoks poreeriti BHK-21 rakkudesse (NB! need rakud ei ekspresseeri T7 RNAP-i) kombinatsioonid järgmistest plasmiididest:

E. wt-replikon + *SG-Helper* + mEF1a-T7auto

F. wt-replikon + *2A-Helper* + mEF1a-T7auto

Kontrolliks poreeriti rakkudesse ka replikon koos autogeeniga, kuid ilma *helper*-ita. Tiitritasse jälgides oli näha, et rakkudel tekkis tsütopaatiline efekt – esialgu ainult kangemates lahjendustes, kuid hiljem kõigis. Punast fluorestsentsi aga näha ei olnud ja see tekitas kahtluse, et mõlemaid kombinatsioone kasutades oli toimunud rekombinatsioon, mille käigus moodustus infektsioonivõimeline viirus ja läks kaduma mCherry-t kodeeriv järjestus. Selle uurimiseks tehti taaskord *Western blot* analüüs, lüüsid 6-augulistel plaatidel olevad rakud 20 tundi pärast nakatamist.

Taaskord analüüsiti nsP1 ja kapsiidivalgu olemasolu proovides (Joonis 7); positiivse kontrollina kasutati ka siin viirusega nakatatud rakkude lüsaati (100x lahjenduses), negatiivse kontrollina aga nakatamata BHK-21 rakkude lüsaati. Positiivse kontrolli puhul on näha ainult kapsiidivalk; ilmselt on selle põhjuseks asjaolu, et lüsaati võeti sellel analüüsil kasutatud tingimuste jaoks liiga väikeses koguses. Analüüsil kasutati erinevate (10-, 1000- ja 1 000 000-kordsete) lahjendustega nakatatud rakkude lüsaate. Saadud tulemused näitavadki, et mõlemal poratsioonil on tekkinud infektsiooniline viirus (VRP-dega nakatamise puhul ei oleks kapsiidivalgu näha), kusjuures viiruse kogus on piisav, et nakatada rakke ka 1 000 000-kordse lahejenduse korral. Peale selle näitas analüüs, et viirus, mis koguti wt-replikon + *SG-Helper*-iga transfekteritud rakkudest, toodab tunduvalt rohkem kapsiidivalgu kui wt-replikon + *2A-Helper*-iga transfekteritud rakkudest kogutud viirus. Selle põhjus on eeldatavasti selles, et esimese juhul (kombinatsioon E) on moodustunud metsikut tüüpi viirus, mis ekspresseerib struktuurseid valke normaalselt (st. *SG* promooteri vahendusel). Teisel juhul (kombinatsioon F) on moodustunud viirus defektne ja struktuursete valkude ekspressioon toimub madalal tasemel. Ka on selle viiruse puhul näha, et ekspresseeritakse veel ka mingit lisavalku (näha paremini suuremate lahjendute korral). Ka see lubab eeldada, et replikombinatsiooni tulemusena tekkinud viirus ei ole wt viirus, vaid selles on puudu (või on ülearu) mingeid viirusele olulisi järjestusi. Selle kindlaks tegemiseks on vaja vastavad viirused plaag-puhastada ja sekveneerida.



**Joonis 7.** BHK-21 rakkudesse poreeriti wt-replikon koos *helper*-i ja autogeeniga. Rakkudest kogutud supernatandi lahjendusi kasutati uute BHK-21 rakkude nakatamiseks, nakatatud rakud lüüsi 20 tunni pärast ning valgud lahutati geel-elektroforeesil. Kapsiidi ja nsP1 vastaste antikehadega detekteeriti nende valkude olemasolu nakatatud rakkudes.

Seega ei õnnestunud antud katsetega ei T7-BHK rakuliinis ega mEF1a-T7auto konstrukti ko-transfekteerimisel VRP-de tootmist testida, sest testsüsteemina kasutatud replikonid ja *helper*-id rekombineerusid omavahel ootamalt kergesti. Selle põhjused pole veel päris selged. On teada, et SFV replikon ja *helper*-RNA rekombineeruvad omavahel, kuid oluliselt väiksema efektiivsusega. See lubab eeldada, et kas T7 RNAP kasutamine suurendab RNA-de rekombinatsiooni sagedust või toimub osa rekombinatsioonist mitte RNA sünteesi käigus, vaid rakku viidud plasmiidsete DNA-de vahel. Viiruse isolaatide plaag-puhastamine ja sekveneerimine võimaldaks hinnata kumma (või mõlema) protsessi tulemusena rekombinatsioon toimub. Seda informatsiooni saaks kasutada järgnevate katsete kavandamiseks. Kui on tegemist RNA sünteesi käigus toimuva *copy-choice* rekombinatsiooniga, saab selle efektiivust vähendada *split-helper* süsteemi kasutades. Sellisel juhul poreeritakse rakkudesse üks replikon ja kaks *helper*-vektorit. Üks neist kodeerib viiruse kapsiidivalku ja teine ülejäänud struktuurseid geene. Seetõttu on infektsioonilise viiruse moodustamiseks vaja nüüd enam mitte ühe, vaid kahe rekombinatsiooni sündmuse toimumine; see peaks oluliselt vähendama rekombinatsiooni tõenäosust. Küll on aga selge, et praegused autogeenid suudavad küll replikoni ja *helper*-i RNAd plasmiidist vabastada, kuid ei ole kõlblikud VRP-de tootmiseks; seda kas väikese efektiivsuse (T7-BHK rakud) ja/või ootamatult efektiivse replikon ja *helper*-i vahel toimuva rekombinatsiooni tõttu (eriti selgelt nähatav mEF1a-T7auto konstrukti kasutamisel).

Üheks täiendavaks autogeeni rakendamise võimaluseks on nende kasutamine replikatsiooni- ja levimisvõimeliste viiruste vabastamiseks cDNA-d sisaldavaist plasmiididest. Hindamaks, kui efektiivsed on meie poolt kasutatavad süsteemid, mõõdeti nende võimet viiruse genoomi vabastada ICA testi abil. ICA aitab hinnata, kui suures osas transfekteritud rakkudes toimub viiruse vabastamine (käivitub viiruse infektsioon). Selle jaoks transfekteriti rakkudesse T7auto ning eelnevalt testimata mEF1a-T7auto konstruktid koos T7-SFV-ga. Kontrolliks poreeriti rakkudesse CMV-SFV-t, mis sisaldab CMV promooterit, mida transkribeerib tuumas raku RNA polümeraas II. Teades, et CMV-SFV infektsioonilisus on kõrge, on seda võrdlusena hea kasutada. ICA tulemused aitavad ka esialgselt hinnata tõenäosust, kas tekkinud viirus on see sama, mille cDNA rakkudesse viidi, või on selle vabanemise ja paljunemise käigus toimunud mutatsioonid. Kui infektsioonilisus on suur, siis on plasmiid efektiivselt rakku läinud ja viirus efektiivselt vabanenud. Kui aga infektsioonilisus on madal, näitab see, et viiruse vabanemine ei ole efektiivne. Kuna viirus vabaneb vaid väikeses arvus rakkudes, siis läbib see mitu infektsioonitsüklit (levides esialgu nakatamata rakkudesse), mille tõttu suureneb tõenäosus mutatsioonide kogunemiseks, eelkõige viiruse genoomi lisatud võõrjärjestuste deleteerimiseks.

Esimeses katses testiti T7auto konstrukti T7-BHK rakuliini abil. Selle jaoks poreeriti T7-BHK rakkudesse järgmised konstruktid:

G. T7-SFV

H. T7-SFV + T7auto

I. CMV-SFV

J. CMV-SFV + T7auto

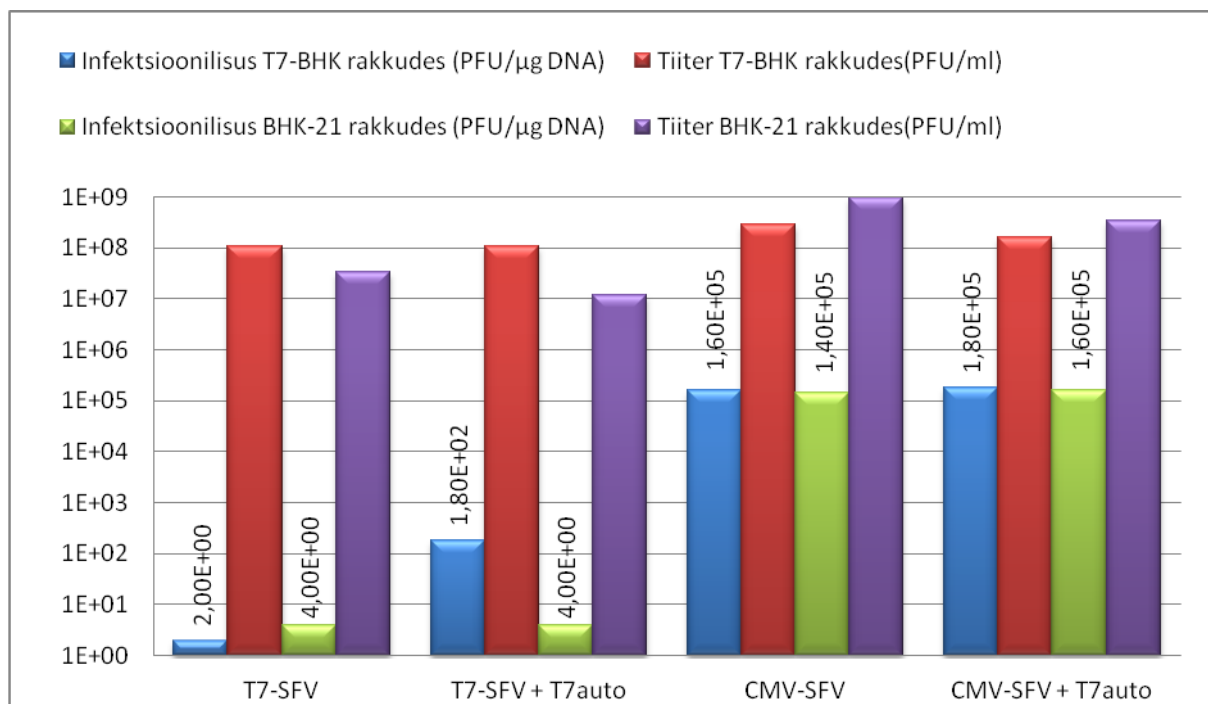
Samad konstruktid poreeriti ka BHK-21 rakkudesse (kombinatsioonid K.-N.), et hinnata, kui suure efekti annab T7auto võrreldes T7-BHK rakuliiniga. Nimelt on varem näidatud, et T7auto suudab käivitada autogeeni ekspressiooni ka endogeense T7 RNAP-i puudumisel, tõenäoliselt tänu plasmiidis leiduvatele krüptilistele raku RNA polümeraas II promooteritele. Poreeritud konstruktidega tehti nii ICA, kui viidi läbi vabanenud viiruse kogumine. ICA värvitud 6-augulistelt plaatidelt loeti plaagid ja nende kaudu arvutati infektsioonilisus ühikutes plaage tekitavaid osakesi 1 µg poreeritud DNA kohta (PFU/µg DNA). Saadud viirust tiiterdati, 6-augulistelt plaatidelt loeti plaagid ja arvutati tiiter ühikutes plaage tekitavaid osakesi milliliitris (PFU/ml) (Joonis 8).

Tulemused näitavad, et pCMV-SFV infektsioonilisust mõjutab T7 RNAP-i olemasolu või puudumine suhteliselt vähe (erinevused on väga väikesed). Küll aga selgus, et BHK-21 rakuliinis T7auto-t kasutades on T7-SFV infektsioonilisus kaks korda suurem kui T7-BHK rakuliinis ilma autogeenita. See kõikumine on samuti tõenäoliselt juhuslik ning mõlemal juhul on tulemus ICA analüüsi tundlikkuse piiril. Selle tõenäoline põhjus on selles, et BHK-21 rakkudes puudub T7 RNAP, mis vabastaks viirust või aktiveeriks autogeeni; autogeeni iseeneslik aktivatsioon ei ole siin ilmselt piisav.

Samas näitasid katsed, et T7auto tõstis T7-BHK rakuliinis oluliselt (umbes 100 korda) T7-SFV infektsioonilisust. Ilmselt aitas autogeen võimendada rakus olevat T7 polümeraasi toimimist. Samuti võib nendest tulemustest järeldada, et viiruse genoomi vabastamiseks T7-SFV plasmiidist on vajalik kõrge T7 RNAP-i kontsenteratsioon. Arvestades, et kõikidel juhtudel oli T7-SFV infektsioonilisus tunduvalt madalam kui CMV-SFV puhul, võib arvata, et limiteerivaks etapiks oli viiruse genoomi vabanemine, mis T7-SFV plasmidi puhul ei toimunud eriti suure efektiivsusega.

Samas peaks igast T7-BHK rakust, kuhu T7-SFV plasmiid sisse läks, moodustuma plaag. Seda aga ei täheldatud. Kõige tõenäolisem põhjus on selles, et T7 RNAP-i tehtud transkriptid ei ole viiruse genoomid: nende 5'-otstes puudub *cap* ja nende 3'-ots pole fikseeritud. Selle tulemusena ei pruugi nende puhul viiruse ns-valkude süntees olla efektiivne (SFV-l puudub IRES element) ja/või ei ole selliste transkriptide seondumine replikaasivalkudega efektiivne. Viimane võimalus on küllalt tõenäoline sest 5'-*cap* on osa viiruse replikaasi äratundmise järjestusest.

Siiski on CMV-SFV maatriksil sünteesitud transkriptid *cap*-eeritud ja korrektsete 3'-otstega, seetõttu on nad tõenäoliselt ka oluliselt infektsioonilisemad. Samas olid vabanenud viiruste tiitrid kõikides katsetes suhteliselt sarnased. See on arusaadav, sest viiruse lõpptiiter ei sõltu sellest, mitu rakku algselt nakkus: kui tekkis üksainuski viirus, siis hakkas ta levima ja nakatas lõpuks kõik rakud. Küll näitavad sarnased tiitrid seda, et T7 polümeraasi olemasolu rakkudes SFV paljunemist oluliselt ei mõjuta.



**Joonis 8. T7-SFV ja CMV-SFV infektsioonilisus ja tiiter.** Rakkudesse viidi elektroporatsiooni meetodil viiruse genoomi cDNA-d sisaldav plasmiid koos või ilma autogeenita. Saadud rakkudega tehti ICA ja toodeti viirust. Kogutud viirus tiiterdati. Nii ICA kui tiiterdmise 6-augulisi tase inkubeeriti enne värvimist umbes 96 tundi. Moodustunud plaagide järgi arvutati infektsioonilisus ja tiiter. Joonisel on toodud kahe katse keskmine tiiter.

Järgnevalt hinnati ka mEF1a-T7auto efektiivust viiruse vabastamisel; ka sellel juhul kasutati võrdlusena CMV-SFV-t. Analüüsi jaoks poreeriti BHK-21 rakkudesse kombinatsioonid järgmistest plasmiididest:

O. T7-SFV

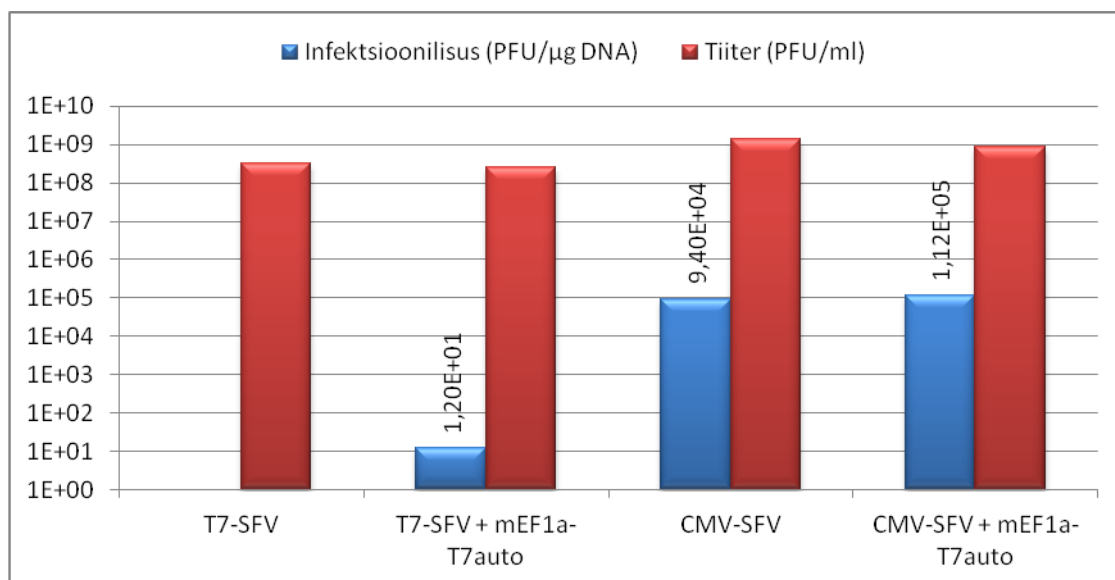
P. T7-SFV + mEF1a-T7auto

Q. CMV-SFV

R. CMV-SFV + mEF1a-T7auto

Poreeritud rakkudega tehti samuti ICA ning toodeti viirust. Tulemused näitavad, et mEF1a-T7auto tõstis T7-SFV infektsioonilisust enam kui T7auto (võrdle Joonis 8 ja Joonis 9). Täpsemat aktivatsiooni efekti ei olnud võimalik määrata, sest ilma mEF1a-T7auto-ta oli T7-SFV infektsioonilisus alla detekteerimispiiri, milleks oli antud katses 2 PFU/μg DNA kohta. Siiski ka koos autogeeniga on T7-SFV infektsioonilisus tunduvalt madalam kui CMV-SFV puhul. Selle tõenäolised põhjused on välja toodud ülal – T7-SFV transkriptid erinevad tunduvalt viiruse genoomidest (ja CMV-SFV transkriptidest). Teoreetiliselt võiks viiruse

infektsiooni takistada ka autogeeni aktiivsus, mis kulutab palju rakus olemasolevatest NTP-dest RNAP-i mRNA-de sünteesiks. Samas, sarnaselt eelmisele katseseeriale, ei mõjutanud mEF1-T7auto viiruse vabanemist CMV-SFV plasmiidist, ega ka mitte viiruse paljunemist (seda on näha sarnastest lõpp-tiitritest). Seega ei ole T7 autogeenid ja SFV teineteise suhtes antagonistlikud.



**Joonis 9. T7-SFV ja CMV-SFV viiruste infektsioonilisus ja tiiter.** BHK-21 rakkudesse viidi elektroporatsiooni meetodil viiruse genoomi cDNA-d sisaldav plasmiid koos või ilma autogeenita. Saadud rakkudega tehti ICA ja toodeti viirust. Kogutud viirus tiiterdati. Nii ICA kui tiiterdmise 6-augulisi tasse inkubeeriti enne värvimist umbes 96 tundi. Moodustunud plaagide järgi arvutati infektsioonilisus ja tiiter. Joonisel on toodud kahe katse keskmine tiiter.

Selles töös saadud tulemused kujutavad endast esimest analüüsi, mis käsitleb autogeenide kasutamist positiivse polaarsusega RNA viiruse genoomi vabastamiseks plasmiidsest vektorist. Ehkki esialgsed, näitavad saadud tulemused et:

- Autogeene saab kasutada viiruse genoomi vabastamiseks; viiruse ja autogeeni vahel antagonismi ei täheldatud.
- Autogeenid võimendavad viiruse genoomi vabanemist T7-BHK rakuliinis.
- Eukarüootse promootriga isekäivituv autogeen võimendab viiruse vabanemist ka rakkudes, milles T7 RNAP-i ei ekspresseerita. Ainult T7 promooteriga autogeeni efekt sellistes rakkudes on tunduvalt väiksem.



d. Autogeenid ei sobi viiruse replikon- ja *helper*-konstruktidega töötamiseks, sest replikatsioonivõimeliste RNA-de vabanemine on vähe-efektiivne. Teiseks oluliseks probleemiks on see, et autogeeni juuresolekul toimuvad sageli rekombinatsioonid replikon- ja *helper*-konstruktide vahel, mis viib replikatsiooni ja levimisvõimelise viiruse tekkimisele.

e. Kõige tõenäolisemaks põhjuseks, miks autogeenide efektiivsus on viiruse genoomi vabastamisel suhteliselt madal, on asjaolu, et T7 RNAP ei sünteesi 5'-otsast *cap*-eeritud ja 3'-otsast korrektelt polüadenüleeritud transkripte; mõlemad need modifikatsioonid on viiruse RNA-de infektsioonilisuseks vajalikud.

Meie laboris oli varem täheldatud, et T7auto on võimeline isekäivituma ka rakkudes, mis algselt T7 RNAP-i ei tooda. Selles töös täheldati, et ka T7-SFV on võimeline sellistes rakkudes viiruse genoomi vabastama. Nii ühel kui teisel juhul on selle tõenäoliseks põhjuseks plasmiidis leiduvad juhuslikud järjestused, mida rakku RNA transkriptsioon tunneb (eeldatavasti väikse efektiivsusega) ära kui RNA polümeraas II promooterid ja sünteesib nendelt RNA-d. Viiruse genoomi puhul on need RNAd ilmselt ka ebakorrektsete otstega, sisaldades viirusele võõraid järjestusi nii genoomi 5'- kui ka 3'-otstes. Asjaolu, et sellised RNA-d suudavad infektsiooni käivitada, on seda enam tähelepanuväärne. Viiruse infektsiooni efektiivne käivitamine autogeenide abil osutus küll tehniliselt raskeks, kuid näitab teist sama tähelepanuväärset fakti – viiruse vabanemine saab alata ka transkriptist, mille 5'-otsas puudub *cap*-struktuur. Seega on see geneetiline element infektsioonilise RNA saamiseks küll vajalik, kuid siiski mitte absoluutselt nõutav.

## KOKKUVÕTE

T7 autogeensüsteemid hõlmavad konstrukte mis sisaldavad T7 promooterjärjestust ja T7 RNAP-i geeni ning võimaldavad rakus toota mistahes huvipakkuvat valku, mida kodeeriv järjestus on viidud T7 promooteri kontrolli alla. Teadlased on kasutanud selliseid süsteeme juba 20 aastat ning pideva arenduse ja testimise tulemusena on välja töötatud mitmeid erinevaid autogeene. Samas ei ole neid süsteeme kasutatud positiivse polaarsusega RNA viiruste uurimiseks, ehkki autogeenid pakuvad võimalusi uurimistööd lihtsustada ja muuta viiruse VRP-de tootmine lihtsamaks ja kuluefektiivsemaks. Lisaks saab autogeene kasutada viirusele vajalike (või viiruse infektsiooni inhibeerivate) valkude üleekspressiooniks. Selleks, et teha kindaks, kas autogeene saab sellises kontekstis kasutada, viidi läbi katsed kasutades Semliki Forest viiruse (SFV) infektsioonilisi plasmide ja replikon-vektoreid. SFV on alfaviirus, mis omab tähtsust nii biotehnoloogias kui ka DNA vaksineerimisel. Ka on alfaviiruste uurimine vajalik, kuna nende seas leidub nii inimeste kui põllumajandusloomade patogeene.

Käesoleva töö eesmärgiks oli testida kahe T7 autogeensüsteemi - T7auto ja mEF1a-T7auto – efektiivsust viiruse või replikoni genoomi vabastamisel plasmidist vektorist. Nende konstruktide ja T7-BHK rakuliini abil uuriti, kas SFV VRP-sid oleks võimalik toota ka DNA baasil ning kas SFV VRP-de tootmise efektiivsust saab suurendada kasutades uutset subgenoomse promooterita *helper*-konstrukti.

Saadud tulemused näitasid, et autogeene saab kasutada SFV genoomi vabastamiseks vektorplasmidist, selleks ülesandeks oli isekäivituv mEF1a-T7auto efektiivsem kui lihtsama ehitusega T7auto. Siiski oli ka parema autogeeni kombineerimisel T7-SFV vektoriga saadud infektsioonilisus oluliselt madalam kui CMV-SFV plasmidil, mille puhul SFV genoomi vabastamist teostab raku RNA polümeraas II. Eeldatavasti on selle põhjuseks oluliste modifikatsioonide, eelkõige 5'-*cap*-struktuuri puudumine, T7 RNAP-i sünteesitud RNA-des.

Tõenäoliselt selsamal põhjusel ei andnud ka SFV replikon-vektor süsteem soovitud tulemusi, VRP-de saagis oli väga tagasihoidlik ja täheldati replikoni ja *helper*-konstruktide vahelise rekombinatsiooni toimumist. Samas ei täheldatud antagonismi autogeensüsteemi toimimise ja SFV replikatsiooni vahel. Seega annavad need tulemused lootust, et autogeene on võimalik alfaviiruste uurimisel kasutada; lisaks genoomide vabastamisele saab autogeenide abil ekspresseerida nakatatud rakus erinevaid geene. See võimalus vajab veel täiendavat uurimist.

Lisaks võivad käesolevas töös testitud autogeensüsteemid leida tulevikus kasutust nii valkude tootmisel kui ka DNA vaksineerimisel ja geeniteraapias.

# Usage of T7 bacteriophage transcription system for releasing Semliki Forest virus genome and replicon-system RNAs from plasmid vectors in eukaryotic cells

Kati Hensen

## SUMMARY

T7 autogene system comprises constructs that contain T7 promoter sequence, T7 RNA polymerase (RNAP) and enable the production of any protein that is under the control of T7 promoter. Scientists have been using these systems for 20 years and as a result of continuous development and testing, many different autogenes have been created. Until now autogenes have not been used in positive-stranded RNA virus research, even though they would simplify studies and make the production of virus-replicon particles (VRPs) easier and more cost effective. Also, autogenes could be used for overexpressing proteins that are necessary for virus infection (or inhibiting it). To determine, whether autogenes can be used in case of positive-stranded RNA viruses, experiments were carried out using Semliki Forest virus (SFV) infectious plasmids and replicon-vectors. SFV is an alphavirus, that is important in biotechnology and DNA vaccination. The importance of studying alphaviruses comes from the fact that among them are human and livestock pathogens.

The aim of this paper was to test the efficiency of releasing virus or replicon genomes from plasmid vector in the context of two T7 autogene systems – T7auto and mEF1a-T7auto. With the help of those constructs and the T7-BHK cell line, it was studied if SFV VRPs could be produced from DNA and whether the efficiency of VRP production could be increased using novel helper-constructs without a subgenomic promoter.

The results demonstrated that autogenes can be used for releasing SFV genome from vector plasmid. Self-initiating mF1a-T7auto was more effective for this purpose than the simpler T7auto. Still, even when combining the better autogene with T7-SFV vector, the infectivity of the virus was significantly lower than with CMV-SFV plasmid, in which case the cell RNA polymerase II releases SFV genome. Presumably the reason for this is the lack of important modifications in the RNA synthesized by T7 RNAP, especially 5'-cap-structure. Most likely for the same reason the SFV replicon-system did not give desired results. The yield of VRPs was very moderate and recombination between replicon and helper-constructs was noted. On the other hand, antagonism between autogene systems and SFV replication was not

seen. This gives hope that autogenes could be used for studying alphaviruses, and furthermore for expressing a variety of genes in an infected cell. However, this possibility still needs more research. Finally, in the future a modified and enhanced variant of the autogene systems tested in this paper can find use in producing proteins, DNA vaccination and gene therapy.

## KIRJANDUSE LOETELU

**Ahola, T., Laakkonen, P., Vihinen, H. ja Kääriäinen.** 1997. Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. *L. J Virol.* 71(1):392-7.

**Atkins, G.J., Sheahan B.J. ja Liljeström, P.** 1999. The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful. *J. Gen. Virol.* 80:2287-2297.

**Barth, B. U., Wahlberg, J. M. ja Garoff, H.** 1995. The oligomerization reaction of the Semliki forest virus membrane protein subunits. *Journal of Cell Biology.* 128(3):283–291.

**Bernard, E. A., Solignat, M., Gay, B., Chazal, N., Higgs, S., Devaux, C. ja Briant, L.** 2010. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS One.* 5(7):e11479.

**Bonner, G., Lafer, E. M., ja Sousa, R.** 1994 . The thumb subdomain of T7 RNAP functions to stabilize the ternary complex during processive transcription. *J. Biol. Chem.* 42, 25120-25128.

**Briebe, L. G. ja Sousa, R.** 2001. The T 7 RNA Polymerase Intercalating Hairpin is Important for Promoter Opening During Initiation but not for RNA Displacement or Transcription Bubble Stability During Elongation. *Biochemistry.* 40:3882-3890.

**Brisson, M., He, Y., Li, S., Yang, J. P. ja Huang, L.** 1999. A novel T7 RNA polymerase autogene for efficient cytoplasmic expression of target genes. *Gene Ther.* 6:263–270.

**Buchholz, U. J., Finke, S. ja Conzelmann, K. K.** 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol.* 73(1):251-9.

**Calisher, C. H., ja N. Karabatsos.** 1988. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution, In T. P. Monath (ed.), *The arboviruses: epidemiology and ecology.* p19-57.

**Chamberlin, M., McGrath, J. ja Waskell, L.** 1970. New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature.* 228(5268):227–231.

- Chen, X., Li, Y., Xiong, K. ja Wagner, T. E.** 1994. A self-initiating eukaryotic transient gene expression system based on cotransfection of bacteriophage T7 RNA polymerase and DNA vectors containing a T7 autogene. *Nucleic Acids Res.* 22(11): 2114–2120.
- Chen, X., Li, Y., Xiong, K., Xie, Y., Aizicovici, S., Snodgrass, R., Wagner, T. E. ja Platika, D.** 1995. A novel nonviral cytoplasmic gene expression system and its implications in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2(4):281-9.
- Deng, H. ja Wolff, J. A.** 1994. Self-amplifying expression from the T7 promoter in 3T3 mouse fibroblasts. *Gene.* 143(2):245-249.
- Doublie, S., Tabor, S., Long, A. M., Richardson, C. C. ja Ellenberger, T.** 1998. Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature* 391, 251- 8.
- Dubendorff, J. W. ja Studier, F. W.** 1991. Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. *J. Mol. Biol.* 219:61–68.
- Farrow, P. J., Barrett, L. B., Stevenson, M., Fisher, K. D., Finn, J., Spice, R., Allan, M. A., Berry, M., Logan, A., Seymour, L. W. ja Read, M. L.** 2006. Cytoplasmic expression systems triggered by mRNA yield increased gene expression in post-mitotic neurons. *Nucleic Acids Res.* 34(11):e80.
- Finn, J., MacLachlan, I. ja Cullis, P.** 2005. Factors limiting autogene-based cytoplasmic expression systems. *The FASEB Journal.* 10.1096/fj.04-2769fje.
- Frolov, I., Hoffman, T. A., Pragai, B. M., Dryga, S. A., Huang, H. V., Schlesinger, S. ja Rice, C. M.** 1996. Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:11371-11377.
- Frolov, I. ja Schlesinger, S.** 1994. Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. *J. Virol.* 68:1721-1727.
- Frolova, E. I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Atasheva, S. ja Frolov, I.** 2010. Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Virol.* 10:11679-11695.

- Gaedigk-Nitschko, K., Ding, M. ja Schleisinger, M. J.** 1990. Site directed mutations in the Sindbis virus 6K protein reveal sites for fatty acylation and the underacylated protein affects virus release and virion structure. *Virology* 175:282-291.
- Galbraith, S. E., Sheahan, B. J. ja Atkins, G. J.** 2006. Deletions in the hypervariable domain of the nsP3 gene attenuate Semliki Forest virus virulence. *J. Gen. Virol.* 87:937-947.
- Gao, X. ja Huang L.** 1993. Cytoplasmic expression of a reporter gene by co-delivery of T7 RNA polymerase and T7 promoter sequence with cationic liposomes. *Nucleic Acids Res.* 21(12):2867-72.
- Gao, X., Jaffurs, D., Robbins, P. D. ja Huang, L.** 1994. A sustained, cytoplasmic transgene expression system delivered by cationic liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:1201-1206.
- Glanville, N. T., Ranki, M. ja Morser, J.** 1976. Initiation of translocation directed by 42S and 26S RNAs from Semliki Forest virus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 73(9):3059–3063.
- Griffin, D. E.** 2007. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott, Williams and Wilkins. Alphaviruses, p. 1023-1068.
- de Groot, R. J., Rümenapf, T., Kuhn, R. J. ja Strauss, J. H.** 1991. Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:8967–71.
- Harrison, S. C.** 1986. Alphavirus structure, p. 21-34. In S. Schlesinger and M. J. Schlesinger (ed.) *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Publishing Corp., New York.
- Helenius, A. ja Kartenbeck, J.** 1980. The effects of octylglucoside on the Semliki forest virus membrane. Evidence for a spike-protein--nucleocapsid interaction. *Eur J Biochem.* 106(2):613–618.
- Jackson, R. J., Hunt, S. L., Gibbs, C. L., ja Kaminski, A.** 1994. Internal initiation of translation of picornavirus RNAs. *Mol. Biol. Rep.* 19:147–159.
- Joyce, C. M. ja Steitz, T. A.** 1994. Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu Rev Biochem.* 63:777-822.
- Justman, J., Klimjack, M. R. ja Kielian, M.** 1993. Role of spike protein conformational changes in fusion of Semliki Forest virus. *Journal of Virology.* 67(12):7597–7607.



- Kielian, M., Chatterjee, P. K., Gibbons, D. L., Lu, Y. E.** 2000. Specific roles for lipids in virus fusion and exit. Examples from the alphaviruses. *Subcell. Biochem.* 34:409–455.
- Liljeström, P. ja Garoff, H.** 1991. Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J. Virol.* 65:147–154.
- Lobigs, M., Hongxing, Z. ja Garoff, H.** 1990. Function of Semliki Forest virus E3 peptide in virus assembly: replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. *Journal of Virology.* 64(9):4346–4355.
- Lusa, S., Garoff, H. ja Liljestrom, P.** 1991. Fate of the 6K membrane protein of Semliki Forest virus during virus assembly. *Virology.* 185(2):843–846.
- Malet, H., Coutard, B., Jamal, S., Dutartre, H., Papageorgiou, N., Neuvonen, M., Ahola, T., Forrester, N., Gould, E. A., Lafitte, D., Ferron, F., Lescar, J., Gorbalenya, A. E., de Lamballerie, X. ja Canard, B.** 2009. The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *J. Virol.* 83:6534-6545.
- Melançon, P. ja Garoff, H.** 1987. Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. *Journal of Virology.* 61(5):1301–1309.
- Miller, D., G., Adam, M., A. ja Miller, A., D.** 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol.* 10(8): 4239–4242.
- Moffat, B. A. ja Studier, F. W.** 1987. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 49:221-227.
- Owen, K. E. ja Kuhn, R. J.** 1996. Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. *Journal of Virology.* 70(5):2757–2763.
- Pehrson, J. R. ja Fuji, R. N.** 1998. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* 26:2837-2842.
- Peränen, J., Laakkonen, P., Hyvönen, M. ja Kääriäinen, L.** 1995. The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology.* 208(2):610-20.

- Powers, A. M., A. C. Brault, Y. Shirako, E. G. Strauss, W. Kang, J. H. Strauss, ja S. C. Weaver.** 2001. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J. Virol.* 75:10118-10131.
- Raju, R., Hajjou, M., Hill, K. R., Botta, V. ja Botta, S.** 1999. In vivo addition of poly(A) tail and AU-rich sequences to the 3' terminus of the Sindbis virus RNA genome: a novel 3'-end repair pathway. *J Virol.* 73(3):2410–9.
- Raskin, C. A., Diaz, G., Joho, K. ja McAllister, W. T.** 1992. Substitution of a single bacteriophage T 3 residue in bacteriophage T 7 RNA polymerase at position 748 results in a switch in promoter specificity. *J Mol Biol.* 228, 506-15.
- Ratnik, K.** 2012. MikroRNAde kasutamine rekombinantsete alfaviiruste paljunemise ja leviku reguleerimiseks. Magistritöö.
- Rikkonen, M., Peränen, J. ja Kääriäinen, L.** 1994. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* 68:5804-5810.
- Robertson, B. H., Grubman, M. J., Weddell, G. N., Moore, D. M., Welsh, J. D., Fischer, T., Dowbenko, D. J., Yansura, D. G., Small, B. ja Kleid, D. G.** 1985. Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. *J Virol.* 54(3):651–660.
- Rubach, J. K., Wasik, B. R., Rupp, J. C., Kuhn, R. J., Hardy, R. W. ja Smith, J. L.** 2009. Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. *Virology* 384:201-208.
- Rusakova, E. E., Tunitskaia, V. L. ja Kochetkov, S.N.** 1999. [Bacteriophage T7 RNA polymerase]. *Mol Biol (Mosk).* 33(3):353-67.
- Ryan, M. D., King, A. M. ja Thomas, G. P.** 1991. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol.* 72(Pt 11):2727–2732.
- Salonen, A., Vasiljeva, L., Merits, A., Magden, J., Jokitalo, E. ja Kaariainen, L.** 2003. Properly folded nonstructural polyprotein directs the Semliki Forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J. Virol.* 77:1691-1702.

- Sanz, M. A., Madan, V., Carrasco, L. ja Nieva, J. L.** 2003. Interfacial domains in sindbis virus 6K protein: detection and functional characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(3):2051–2057.
- Sariola, M., Saraste, J. ja Kuismanen, E.** 1995. Communication of post-Golgi elements with early endocytic pathway: regulation of endoproteolytic cleavage of Semliki Forest virus p62 precursor. *Journal of Cell Science*. 108, part 6:2465–2475.
- Sawicki, D. L. ja Sawicki, S. G.** 1980. Short-lived minus-strand polymerase for Semliki Forest virus. *Virology Journal*. 34: 108-118.
- Schlesinger, S. ja Schlesinger, M. J.** 2007. *Togaviridae: The viruses and their replication*, p. 1001-1022. In: *Fields Virology*, 5th edn. (Kuhn, R.J), Lippincott. Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J. M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M. P., Brehin, A. C., Cubito, N., Despres, P., Kunst, F., Rey, F. A., Zeller, H. ja Brisse, S.** 2006. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*.3(7):e263.
- Sherman M. B. ja Weaver S. C.** 2010. Structure of the Recombinant Alphavirus Western Equine Encephalitis Virus Revealed by Cryoelectron Microscopy. *J Virol*. 84(19): 9775–9782.
- Shin, G., Yost, S. A., Miller, M. T., Elrod, E. J., Grakoui, A. ja Marcotrigiano, J.** 2012. Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(41):16534-9.
- Shirako, Y. ja Strauss, J.** 1994. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*. 68(3):1874–1885.
- Singh, I. ja Helenius, A.** 1992. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapside uncoating. *Virology Journal*. 66, 7049-7058.
- Smerdou, C. ja Liljeström, P.** 1999. Non-viral amplification systems for gene transfer: vectors based on alphaviruses. *Curr Opin Mol Ther*. 1(2):244-51.

**Smith, D. W., J. S. Mackenzie, ja S. C. Weaver.** 2009. Alphaviruses, p. 1241-1274. In D. D. Richman, R. J. Whitley, and F. G. Hayden (ed.), Clinical virology. ASM Press, Washington, DC.

**Spuul, P., Balistreri, G., Hellström, K., Golubtsov, A. V., Jokitalo, E. ja Ahola T.** 2011. Assembly of alphavirus replication complexes from RNA and protein components in a novel trans-replication system in mammalian cells. *J Virol.* 85(10):4739-51.

**Steitz, T. A.** 1998. A mechanism for all polymerases. *Nature* 391, 231- 2.

**Strauss, J. H. ja E. G. Strauss.** 1976. In D. P. Nayak (ed.), The molecular biology of animal viruses. Togaviruses, p. 111-166.

**Strauss, E. G. ja J. H. Strauss.** 1986. Structure and replication of the alphavirus genome, p. 35-90. In S. Schleisinger and M. J. Schleisinger (ed.), The Togaviridae and Flaviviridae. Plenum Publishing Corp., New York.

**Strauss, J. H. ja Strauss, E. G.** 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58: 491-562.

**Zheng, H., Tian, H., Jin, Y., Wu, J., Shang, Y., Yin, S., Liu, X. ja Xie, Q.** 2009. Development of a hamster kidney cell line expressing stably T7 RNA polymerase using retroviral gene transfer technology for efficient rescue of infectious foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods.* 156(1-2):129-37.

**Tabor, S. ja Richardson, C. C.** 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 82:1074-1078.

**Takkinen, K., Peränen, J. ja Kääriäinen, L.** 1991. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein. *Journal of General Virology.* 72(7):1627–1633.

**Tamm K.** 2006. Semliki Forest viiruse mittestruktuurse valgu nsP2 tuumalokalisatsiooni mutantide fenotüüpide kirjeldamine. Magistritöö.

**Tamm, K., Merits, A. ja Sarand, I.** 2008. Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus. *J Gen Virol.* 89(3):676-686.

- Tong, L., Wengler, G. ja Rossmann, G. M.** 1993. Refined structure of Sindbis virus core protein and comparison with other chymotrypsin-like serine proteinase structures. *J. Mol. Biol.* 230:228-247.
- Ujvari, A. ja Martin, C. T.** 1997. Identification of a minimal binding element within the T 7 RNA polymerase promoter. *J Mol Biol* 273, 775-81.
- Varjak, M., Zusinaite, E. ja Merits, A.** 2010. Novel functions of the alphavirus nonstructural protein nsP3 C-terminal region. *J Virol.* 84(5):2352-64.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P. ja Kääriäinen, L.** 2000. Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus: RNA 5'-triphosphatase activity of nsP2. *J. Biol. Chem.* 275:17281-17287.
- Vogel, R. H., Provencher, S. ja von Bonsdorff, C. H.** 1986. Envelope structure of Semliki Forest virus reconstructed from cryo-electron micrographs. *Nature.* 320(6062):533–535.
- Wahlberg, J., Boere, W. A. M. ja Garoff, H.** 1989. The heterodimeric association between the membrane proteins of Semliki Forest virus changes its sensitivity to low pH during virus maturation. *Journal of Virology.* 63(12):4991–4997.
- Weaver, S. C., Frey, T. K., Huang H. V., Kinney, R. M., Rice, C. M., Roehrig, J. T., Shope, R. E. ja Strauss, E. G.** 2005. In C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (ed.), *Virus taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Togaviridae*, p. 999-1008.
- Weiss, B., Nitschko, H., Ghattas, L., Wright, R. ja Schlesinger, S.** 1989. Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis RNAs. *J. Virol.* 63:5310-5318.
- Weston, J., Villoing, S., Brémont, M., Castric, J., Pfeffer, M., Jewhurst, V., McLoughlin, M., Rødseth, O., Christie, K. E., Koumans, J. ja Todd, D.** 2002. Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. *J. Virol.* 76(12):6155–6163.
- Weston, J. H., Welsh, M. D., McLoughlin, M. F. ja Todd, D.** 1999. Salmon pancreas disease virus, an alphavirus infecting farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Virology.* 256(2):188–195.

**Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. ja Felgner, P. L.** 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 247(4949 Pt 1):1465-8.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kati Hensen (sünnikuupäev: 10.08.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Bakteriofaag T7 transkriptsioonisüsteemi kasutamine Semliki Forest viiruse genoomi ja replikon-süsteemi RNA-de vabastamiseks plasmiidsetest vektoritest eukarüootses rakus,

mille juhendajad on Age Utt ja Andres Merits,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013